

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Departamento de Fitotecnia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Sementes



TESE

**Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de
abóbora durante o desenvolvimento**

Patrícia Pereira da Silva

Pelotas, 2014

Patrícia Pereira da Silva

**Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de
abóbora durante o desenvolvimento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros

Co-Orientador: Dr. Warley Marcos Nascimento

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586c Silva, Patrícia Pereira da

Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de abóbora durante o desenvolvimento / Patrícia Pereira da Silva ; Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros, orientador ; Warley Marcos Nascimento, coorientador. — Pelotas, 2014.

112 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Híbrido interespecífico. 2. Análise de imagens. 3. Enzimas antioxidantes. I. Barros, Antonio Carlos Souza Albuquerque, orient. II. Nascimento, Warley Marcos, coorient. III. Título.

CDD : 635.62

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Patrícia Pereira da Silva

**Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de
abóbora durante o desenvolvimento.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

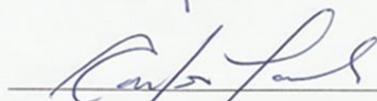
Banca examinadora:



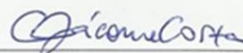
Prof. Antonio C. S.A. Barros
UFPel
(Orientador)



Dr. Warley Marcos Nascimento
Embrapa Hortaliças
(Co-orientador)



Prof. Carlos Rogério Mauch
UFPel



Dr.ª Caroline Jácome Costa
Embrapa Clima Temperado



Dr. Elbio Treicha Cardoso
Embrapa Produtos e
Mercado

**“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine sem
aplausos”.**

Charles Chaplin

**“Aos meus pais Antônio e Maria, minha filha
Thaissa, minhas irmãs Mariana e Viviane e
meu sobrinho Miguel, pelo carinho, apoio e
confiança, dedico”.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros, pela orientação, apoio, confiança e ensinamentos.

Ao Dr. Warley Marcos Nascimento, pela co-orientação, pela amizade, solidariedade, apoio, além do grande exemplo de profissionalismo, meu muito obrigada!

Ao Prof. Francisco Amaral Villela pela atenção e paciência concedidas.

A Universidade Federal de Pelotas, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Ao Antônio Carlos Madruga Bandeira, secretário do Programa de Ciência e Tecnologia de Sementes, por oportunizar sua amizade e bons momentos de convivência, e acima de tudo, paciência.

A Embrapa Hortaliças, por disponibilizar suas instalações para execução deste trabalho e aos pesquisadores Agnaldo Donizete e Giovani Olegário, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ, em especial ao Prof. Júlio Marcos Filho e ao Dr. Francisco G. Gomes Junior, pela disponibilização do laboratório e equipamentos, além da ajuda financeira, para realização dos testes de raios - X e SVIS.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial à Prof^a. Denise Dias e a seu estudante Marcelo Coelho Sekita, pela disponibilização do laboratório, equipamentos e reagentes para realização dos testes bioquímicos.

A Universidade Federal de Lavras, em especial à Prof^a. Édila Vilela de Resende Von Pinho e a Dra. Tanismare Silva, pela disponibilização do laboratório, equipamentos e reagentes para realização dos testes da proteína LEA.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os amigos ‘da Sementes’, em especial, Dani Olsen, Cissa Zambiasi, Pablo Cadore e ao Neander Silveira, cujos caminhos se cruzaram

diante de um ideal comum, sempre soubemos conviver e nos respeitar, ainda que nem sempre compartilhássemos as mesmas ideias, empreendemos muitas lutas juntos e muitas ainda nos aguardam talvez em trilhas diferentes.

À minha família, meu porto seguro, que sempre me apoiou e me incentivou. Muito obrigada!

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desta importante etapa da minha vida!

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	11
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	17
Introdução Geral	18
Revisão de Literatura	21
Referências Bibliográficas	26

Capítulo I - Análise fisiológica de sementes híbridas de abóbora durante o seu desenvolvimento

Resumo	32
Abstract	33
Introdução	33
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	39
Referências Bibliográficas	47

Capítulo II - Alterações bioquímicas em sementes híbridas de abóbora em diferentes estádios de maturação

Resumo	51
Abstract	52
Introdução	52
Material e Métodos	54
Resultados e Discussão	59
Referências Bibliográficas	69

Capítulo III – Estudo morfológico de sementes híbridas de abóbora em diferentes estádios de maturação através do uso de raios-X

Resumo	76
Abstract	77

Introdução	78
Material e Métodos	80
Resultados e Discussão	83
Referências Bibliográficas	89

Capítulo IV – Avaliação do vigor de sementes híbridas de abóbora

utilizando análise computadorizada de imagens.....	93
Resumo	93
Abstract	94
Introdução	95
Material e Métodos	97
Resultados e Discussão	100
Referências Bibliográficas	106

Conclusão final	112
------------------------------	------------

Resumo Geral

SILVA, Patrícia Pereira. **Características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de sementes de abóbora durante o desenvolvimento**. 2014. 112f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

A partir da maturidade fisiológica iniciam-se, nas sementes, alterações degenerativas que comprometem a germinação e o vigor. Assim, o reconhecimento prático da maturidade fisiológica é estratégico para a definição do momento ideal de colheita, contribuindo para a produção de sementes de elevada qualidade fisiológica e sanitária. Em geral, para espécies cujas sementes estão contidas em frutos carnosos, como é o caso da abóbora, a máxima germinação e vigor ocorrem quando as sementes atingem a maturidade fisiológica, ou seja, o máximo conteúdo de matéria seca. A partir daí, a germinação e vigor geralmente declinam. Contudo, há controvérsias quanto à ocorrência da qualidade máxima das sementes durante o seu desenvolvimento. No caso do gênero *Cucurbita*, a possibilidade de realização de colheitas antecipadas dos frutos antes das sementes atingirem o ponto de maturidade fisiológica pode ser uma alternativa para o produtor de sementes. Nesse caso, os frutos devem passar por um período de armazenamento de modo a proporcionar a complementação do processo de maturação das sementes. Os principais estudos referentes à maturação de sementes estão relacionados ao monitoramento das modificações fisiológicas que acontecem durante o processo, especialmente, conteúdo de matéria seca, germinação e vigor. São escassas as informações referentes às alterações bioquímicas, como proteínas e isoenzimas, além da utilização de imagens, como raios – X. Assim, o objetivo geral deste estudo foi o monitoramento das alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas em sementes híbridas de abóbora obtidas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação e submetidos ao armazenamento pós-colheita, buscando caracterizar a maturidade fisiológica das sementes e com isso definir o ponto ideal de colheita. Foi observada que a maturidade fisiológica das sementes ocorreu em sementes

provenientes de frutos colhidos aos 60 dias após à antese e armazenados por 20 dias. Nesse estágio, as sementes encontravam-se com o máximo acúmulo de matéria seca, máxima germinação e vigor além do reduzido teor de água; alta concentração de proteínas LEA e baixa atividade das enzimas antioxidantes também foram observados, demonstrando que as sementes encontravam-se fisiologicamente maduras.

Palavras-chaves: híbrido interespecífico, análise de imagens, enzimas antioxidantes.

Abstract

SILVA, Patricia Pereira. **Physiological, biochemical and morphological characteristics of pumpkin seeds during development**. 2014. 110f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

From the beginning, of seed physiological maturity, occur degenerative changes that impair the germination and vigor. Thus, the practical recognition of physiological maturity is strategic for defining the ideal time of harvesting, contributing to the production of seeds of high physiological and sanitary quality. In general, for species whose seeds are contained in fleshy fruits, such as pumpkin, maximum germination and vigor occur when the seeds reached physiological maturity, i.e., the maximum dry matter content. Thereafter, seed germination and vigor usually decline. However, there is controversy as to the occurrence of maximum quality during seed development. In the case of the genus *Cucurbita*, the possibility of holding early fruit harvesting before the seeds reach the point of physiological maturity may be an alternative to the seed grower. In this case, the fruit must undergo a period of storage so as to provide the completion of seed maturation process. The main studies on the seed maturation are related to the monitoring of physiological changes that occur during the process, especially dry matter content, germination and vigor. There is little information regarding the biochemical changes, such as proteins and isoenzymes, besides the use of images, such as X- ray. Thus, the aim of this study was the monitoring of physiological, biochemical and morphological changes in pumpkin seeds obtained from fruits harvested at different maturity stages and subjected to post-harvest storage, seeking to characterize the physiological maturity of seeds and thereby define the ideal harvest. It was observed that the physiological maturity occurred in seeds from fruits harvested at 60 days after anthesis and stored for 20 days. At this stage, seeds met with maximum dry matter accumulation, maximum germination and vigor and reduced water content; high concentration of LEA proteins and low activity of antioxidant enzymes were also observed, demonstrating that seed reach the

physiological maturity.

Key Words: interspecific hybrid, image analysis , antioxidant enzymes .

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Produção de sementes de abóbora em telado e flor feminina de abóbora etiquetada após a polinização manual	36
Figura 2. Armazenamento de frutos por 20 dias.....	36
Figura 3. Extração e lavagem das sementes utilizando cal hidratada para remoção da mucilagem; Secagem das sementes à temperatura ambiente por 24 horas e secagem das sementes em uma câmara com ventilação e temperatura de 32°C por 48 horas.....	37
Figura 4. Teor de água das sementes híbridas de abóbora, antes da secagem, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	40
Figura 5. Média da germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias	41
Figura 6. Média da primeira contagem de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	42
Figura 7. Índice de velocidade de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	43
Figura 8. Média da emergência de plântulas em casa de vegetação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	44
Figura 9. Índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	44
Figura 10. Média da massa de 1000 sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	45

Figura 11. Média do peso seco de plântulas de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	46
--	----

Capítulo II

Figura 1. Coloração do gel, na análise de proteínas resistentes ao calor LEA, com a solução de Coomassie Blue	56
Figura 2. Espectrofotômetro Analítica, modelo Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS 10S, utilizado na análise das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato.....	58
Figura 3. Perfil eletroforético da proteína LEA em sementes de abóbora híbrida cultivar Jabras obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAA e armazenados por 0 e 20 dias.....	60
Figura 4. Média da germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias	61
Figura 5. Média da primeira contagem de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	61
Figura 6 Concentração de proteína solúvel total em sementes híbridas de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAA e armazenados por 0 e 20 dias.....	62
Figura 7. Teor de água das sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	63
Figura 8. Concentração da proteína superóxido dismutase (SOD) em sementes híbridas de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	64
Figura 9. Concentração da proteína catalase (CAT) em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	66
Figura 10. Concentração da proteína peroxidase (POX) em sementes híbridas de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	67

Figura 11. Concentração da proteína ascobarto da peroxidase (APX) em sementes híbridas de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	68
---	----

Capítulo III

Figura 1. Equipamento FAXITRON X-Ray, modelo MX-20, utilizado para realização da análise de raio-x.....	82
Figura 2. Teor de água das sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	84
Figura 3. Média da primeira contagem de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	86
Figura 4. Média da germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	86
Figura 5. Sementes de abóbora ‘Jabras’ classificadas como cheias e apresentando plântulas normais e anormais.....	87
Figura 6. Sementes de abóbora ‘Jabras’ classificadas com vazia, mal formada e cheia, e as suas respectivas plântulas no final do período de germinação, apresentando respectivamente, semente não germinada, plântula anormal e plântula normal.....	88

Capítulo IV

Figura 1. Plântulas de abóbora ‘Jabras’ em um escâner HP Scanjet 2004 montado de maneira invertida no interior de uma caixa de alumínio com 6cm x 50cm x 12cm e operado pelo software Photosmart	98
Figura 2. Média da germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) armazenados por 0 e 20 dias.....	100
Figura 3. Média da primeira contagem de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....	102

Figura 4. Teste de envelhecimento acelerado com uso de soluções saturadas de sal em sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....103

Figura 5. Média da massa de 1000 sementes de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....104

Lista de Tabelas

Capítulo III

Tabela 1. Número de sementes cheias (SC), mal formadas (SM) ou vazias (SV) de abóbora ‘Jabras’ provenientes de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação (DAA) e armazenados em duas épocas.....85

Capítulo IV

Tabela 1. Valores médios obtidos na análise dos índices de vigor, uniformidade e comprimento de plântulas determinados em análises SVIS[®], em sementes híbridas de abóbora ‘Jabras’, provenientes de frutos colhidos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.....104

Introdução Geral

As abóboras são classificadas na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida (Dicotiledôneas), subclasse Dilleniidae, ordem Violales, família Cucurbitaceae, tribo Cucurbiteae, gênero *Cucurbita* (WHITAKER e ROBINSON, 1986). A família Cucurbitaceae é formada por 118 gêneros e aproximadamente 825 espécies. Entre as espécies cultivadas, a abóbora (*Cucurbita moschata*), abobrinha (*Cucurbita pepo*) e a moranga (*Cucurbita maxima*) são as que mais se destacam, juntamente com a melancia (*Citrullus lanatus*) e o melão (*Cucumis melo*) (BARBIERI et al., 2006). As cucurbitáceas compõem a segunda família de maior importância econômica e, inserida nela, incluem-se as abóboras cuja produção mundial no ano de 2010 foi de 22,4 milhões de toneladas, cultivadas em área de 1,67 milhão de hectares, proporcionando uma produtividade média de 13,4 t ha⁻¹ (FAO, 2014).

O gênero *Cucurbita* é formado, pelo menos, por 15 espécies e tem cinco importantes espécies domesticadas: *C. pepo* L. (abobrinha), que é a espécie mais cultivada, *C. maxima* Duchesne (morangas), *C. moschata* Duchesne (abóbora), *C. ficifolia* Huber (gila) e *C. argyrosperma* Boucher (mogango) (SANJUR et al., 2002). Apenas as três primeiras são cultivadas no Brasil utilizando sementes comerciais. O cultivo de *C. ficifolia* e *C. argyrosperma* é realizado, ainda, quase que exclusivamente por sementes crioulas há pelo menos 70 anos. Vale salientar que o mercado brasileiro de abóboras e morangas tem evoluído em direção ao híbrido japonês do tipo tetsukabuto .

Esse híbrido interespecífico, resultante do cruzamento entre *Cucurbita maxima* Duch (progenitor feminino) e *Cucurbita moschata* Duch (progenitor masculino), caracteriza-se por ser mais precoce e mais produtivo e apresenta frutos mais uniformes, quando comparados às cultivares regionais de polinização aberta (PEDROSA et al., 1982; NASCIMENTO et al., 2011). Estas abóboras lideram a preferência do mercado consumidor, dadas as suas excelentes propriedades culinárias. Embora diversos híbridos nacionais de abóbora tipo tetsukabuto já tenham sido desenvolvidos, a produção de sementes em nossas condições não tem sido eficiente, impossibilitando o atendimento de toda a demanda interna. Em 2010, o mercado de sementes de

abóbora japonesa foi de R\$ 10,5 milhões (ABCSem, 2011), com importação de quase a totalidade das sementes, notadamente do Japão (Nascimento et al., 2011) com um custo anual de US\$ 1 milhão. Este valor pode chegar a US\$ 2,4 milhões, em nível de produtor (ABCSem, 2011).

Para que altos níveis de produtividade sejam alcançados, é preciso a obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica. Um dos parâmetros para se obter sementes de qualidade é a realização da colheita no ponto de maturidade fisiológica ou próximo a ele. O processo de maturação tem início a partir da fecundação do óvulo e se estende até o ponto de maturidade fisiológica. Durante esse processo, ocorrem várias transformações morfológicas e fisiológicas nas sementes, como por exemplo, aumento de tamanho, modificações no teor de água, na germinação e vigor (BARROS, 1986).

A maturidade do fruto está diretamente relacionada com a germinação e vigor da semente. Alguns trabalhos com sementes das espécies de cucurbitáceas têm mostrado que, após a colheita dos frutos, as sementes apresentam maior porcentagem de sementes maduras e maiores índices de germinação e vigor (BARBEDO et al., 1994). Para as hortaliças de frutos carnosos, como a abóbora, nem sempre é preciso esperar a maturação fisiológica no campo. Essa maturação pode ocorrer quando os frutos colhidos permanecem por um período de repouso em local fresco e ventilado, antes da extração das sementes (NASCIMENTO et al., 2000).

A partir da maturidade fisiológica iniciam-se nas sementes alterações degenerativas que comprometem a sua germinação e vigor (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). O processo de germinação ocorre através de uma sequência de reações bioquímicas no qual as substâncias de reserva são clivadas, transportadas e ressintetizadas no eixo embrionário (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006). Logo após a hidratação das sementes, ocorre incremento no metabolismo, observado pelo aumento da taxa respiratória e ativação de enzimas respiratórias e hidrolíticas (HÖFS et al., 2004). Assim, o reconhecimento prático da maturidade fisiológica é estratégico para a definição do momento ideal de colheita, contribuindo para a produção de sementes de elevada qualidade fisiológica e sanitária. Várias técnicas vêm auxiliando na

compreensão do mecanismo de ação de diferentes enzimas envolvidas no desenvolvimento das plantas, bem como na produção de sementes.

A solução para problemas que dificultam a obtenção de sementes de elevada qualidade fisiológica é fundamental para colocar a produção nacional em condições de competitividade com as sementes importadas. Os principais estudos referentes à maturação de sementes de abóbora estão relacionados ao monitoramento das modificações fisiológicas que acontecem durante o processo, especialmente, conteúdo de matéria seca, germinação e vigor. São escassas as informações referentes às alterações bioquímicas e estudos de imagens em sementes provenientes de diferentes épocas de maturação, visando assim à determinação da melhor época para a realização da colheita dos frutos e um maior entendimento da formação e desenvolvimento das sementes.

Deve ser destacado, também, que a identificação da época e momento da maturidade fisiológica das sementes é fundamental para o estabelecimento de diretrizes visando o manejo adequado durante e após a colheita, procurando minimizar a velocidade e a intensidade da deterioração. Este tema tem sido estudado para várias espécies de importância econômica, mas em menor escala para as cucurbitáceas e outras espécies caracterizadas pela produção de frutos carnosos. Nestas, há dificuldade para identificação da maturidade dos frutos e das sementes, pois sua formação é contínua (PEDROSA et al., 1987; BARBEDO et al., 1994).

Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de tecnologias para a produção de sementes, principalmente tratando-se de espécies importantes e tradicionais da dieta alimentar brasileira. Estudos envolvendo novas cultivares, como é o caso de 'Jabras' (híbrido F1 interespecífico de abóbora do tipo tetsukabuto, desenvolvido pela Embrapa Hortaliças), devem ser realizados visando maior conhecimento do seu comportamento quanto a produção e obtenção de sementes de elevada qualidade fisiológica. A abóbora foi escolhida neste estudo como modelo, entretanto, os resultados obtidos poderão ser utilizados em alguns aspectos da tecnologia de produção de sementes de outras espécies de cucurbitáceas, como melão, melancia e pepino.

Revisão de Literatura

Maturação de sementes de abóbora

O conjunto de transformações pelas quais passa o óvulo fertilizado até atingir a máxima potencialidade de desempenhar suas funções vitais, quais sejam, germinação, vigor, matéria seca e tamanho das sementes é objeto de estudo da maturação de sementes. Deste ponto em diante, a semente encontra-se praticamente desligada da planta - mãe, dela recebendo nada ou quase nada dos fotossintetizados produzidos e estando apta a desempenhar as funções fisiológicas que lhe são inerentes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Diz-se que a semente atingiu o “ponto de maturidade fisiológica”, a partir do qual as únicas transformações evidentes passam a ser a progressiva desidratação e deterioração da mesma. Desta forma, o estabelecimento do ponto de maturidade fisiológica da semente assume grande importância na racionalização das colheitas que objetivem a produção de sementes de elevada qualidade fisiológica e, até certo ponto, qualidade sanitária, uma vez que, quanto maior o tempo decorrido entre o ponto de maturidade fisiológica e a colheita, mais sujeita está a semente às adversidades climáticas e ao ataque de pragas e microrganismos.

O momento da ocorrência do ponto de maturidade fisiológica das sementes varia grandemente em função das condições ambientais predominantes, da espécie, cultivar ou híbridos utilizados, podendo, em alguns casos, estar associado a modificações nas características morfológicas dos frutos e sementes, o que facilita a sua identificação no campo (CASTRO et al., 2002).

Atividades de proteínas LEA

O início do processo de maturação fisiológica das sementes é caracterizado por intensa divisão e expansão celular e a diferenciação dos tecidos, processo conhecido como histodiferenciação (BEWLEY e BLACK, 1994). Após esse processo, ocorre aumento progressivo da massa seca das sementes, que atinge o máximo e, geralmente coincide com o máximo de germinação, caracterizando o ponto de maturidade fisiológica. A partir, desse ponto começa a ocorrer a desidratação das sementes (BEWLEY e BLACK,

1994; MARCOS-FILHO, 2005).

Nas fases iniciais do desenvolvimento, as sementes não são capazes de tolerar a dessecação. A aquisição dessa tolerância está relacionada a dois mecanismos protetores que se instalam antes ou durante a fase de desidratação das sementes: a síntese de açúcares solúveis e a síntese de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (HOEKSTRA et al., 2001).

As proteínas LEA são hidrofílicas, estáveis, não se desnaturam sob alta temperatura, são sintetizadas no início do desenvolvimento das sementes, quando o conteúdo de ABA ainda é alto e durante a fase de desidratação rápida que ocorre no final da maturação (GALAU et al., 1987; HAN et al., 1997). Alguns estudos relatam que as proteínas LEA também podem ser acumuladas em resposta ao estresse hídrico, baixa temperatura ou salinidade (HONG-BO, et al., 2005).

Os principais estudos sobre maturação fisiológica de sementes de abóboras são sobre as modificações fisiológicas, e estudos referentes às alterações que ocorrem na atividade de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento e maturação das sementes são escassos.

Alterações enzimáticas

Entender as mudanças que ocorrem nas sementes, nos diferentes estádios de desenvolvimento, à medida que estas perdem água, é de fundamental importância para o desenvolvimento de metodologias de secagem de sementes colhidas com altos teores de água. É sabido que, com a progressiva perda de água após a maturidade fisiológica, as sementes tornam-se mais tolerantes a temperaturas mais elevadas de secagem, indicando que eventos bioquímicos e metabólicos ocorrem juntamente com a redução do teor de água (ROSA et al., 2004). Segundo ELLIS e HONG, (1996), existem consideráveis evidências de que a tolerância a secagem pode ser induzida em sementes imaturas (estádios intolerantes), ou mesmo em sementes maduras intolerantes, por meio de tratamentos que imitem os eventos que ocorrem durante a secagem natural das sementes.

A deterioração das sementes também está relacionada com a perda da integridade das membranas celulares (SUN e LEOPOLD, 1993). Por serem constituídas de uma dupla camada lipídica, as membranas são o sítio principal

do processo de peroxidação de lipídeos, que levam à produção de radicais livres altamente reativos, causando desorganização celular e, em consequência, provocando declínio no vigor das sementes (McDONALD, 1999). No entanto, as células possuem complexo sistema de defesa contra a ação de radicais livres.

Os radicais livres acumulam porque sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados (HENDRY, 1993). Segundo HOEKSTRA et al., (1996), a atividade de radicais livres em sementes pode ser atenuada por removedores e pela presença do citoplasma no estado vítreo. As sementes, de uma maneira geral, são bem providas de moléculas antioxidantes e sistemas removedores, tais como, os solúveis em lipídios (isômeros de tocoferol-vitamina E e β -caroteno) ou os solúveis em água (ácido ascórbico-vitamina C e glutathione).

Nesse mecanismo de proteção, estão envolvidas várias enzimas e peróxidos, tais como superóxidos dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase (PUNTARULO et al., 1991; ÇAKMAK et al., 1993). Estudar as variações nos perfis das enzimas envolvidas no processo de deterioração pode trazer informações importantes sobre as alterações bioquímicas resultantes da deterioração de sementes de abóbora.

Análise de raios-X

A análise de imagens tem sido utilizada para várias finalidades, mas a disponibilidade de equipamentos e a quantidade de trabalhos realizados na área de tecnologia de sementes ainda não tem merecido a devida importância.

Entre os métodos para análise de imagens, destaca-se o teste de raios - X, indicado pela ISTA - *International Seed Testing Association* desde 1993, para diferenciação entre sementes bem formadas (estruturadas) ou parcialmente formadas, danificadas mecanicamente ou por organismos nocivos; permite, ainda, efetuar verificações da evolução do desenvolvimento das sementes, avaliando o grau de normalidade desse processo, mediante o exame do progresso da diferenciação dos tecidos embrionários e de suas relações com os tecidos de reserva.

O princípio da técnica de raios-X baseia-se na impressão de uma película sensível logo após sua exposição a uma fonte de radiação e na

consequente obtenção de uma imagem do objeto irradiado. Esta pode ser conservada, reproduzida e examinada a qualquer momento.

O teste de raios-X deve ser executado com o conhecimento necessário das condições adequadas de exposição das sementes à radiação. Assim, a qualidade ou o poder de penetração dos raios-X é determinado pela quilovoltagem do equipamento. O período de exposição, juntamente com a miliamperagem fixa do equipamento, regulam a quantidade de raios-x que determina a densidade radiográfica ou o grau de escurecimento. Nesse sentido, diferentes interações entre voltagem e período de exposição para a obtenção de alta fidelidade das imagens radiográficas de sementes têm sido adotadas em função da espécie, do equipamento de raios-X e da sensibilidade da película fotográfica utilizada (CARVALHO et al., 1999).

O método apresenta a particularidade de não destruir os objetos examinados, ser rápido e permitir a avaliação morfológica das estruturas internas da semente, como o embrião e os tecidos de reserva; desta maneira, é possível associar o estado de áreas vitais ao desempenho das sementes. Além disso, as imagens obtidas poderão ser catalogadas, arquivadas e utilizadas posteriormente para a definição de critérios de avaliação não subjetivos, padronizados e, conseqüentemente, mais precisos que os provenientes daqueles baseados apenas na visão humana (MENEZES et al., 2005; ISTA, 2004).

A partir de trabalhos iniciais realizados com o emprego de raios-X, a evolução do conhecimento conduziu aos estudos sobre imagens digitais, com a utilização de “scanners” e câmeras fotográficas digitais, envolvendo o processamento em computador, a associação entre raios-x e o potencial fisiológico, com o auxílio de programas computacionais (“softwares”) específicos. Essa análise consiste na obtenção de informações a respeito de objetos registrados em uma imagem digital, com base em algumas características como cor, textura, entre outras. As informações são mais detalhadas quando é efetuada a combinação entre as imagens digitais e as radiografias, permitindo identificar tanto as alterações de maior como as de menor extensão (“microdanos”), além de efetuar a associação entre os tipos, localização e extensão das injúrias (externas e internas) e o desempenho das sementes.

Deve-se destacar também que a identificação da época e momento de maturidade fisiológica das sementes é fundamental para o estabelecimento de diretrizes visando o manejo adequado durante e após a colheita, procurando minimizar a velocidade e a intensidade da deterioração. Este tema tem sido estudado para várias espécies de importância econômica, mas em menor escala para as hortaliças, incluindo cucurbitáceas e outras caracterizadas pela produção de frutos carnosos. Nestas, há dificuldade para identificação da maturidade dos frutos e sementes, pois sua formação é contínua (PEDROSA et al., 1987; BARBEDO et al., 1994).

Nessa situação, a análise de imagens pode constituir uma valiosa ferramenta para caracterizar a evolução da maturação e identificar as alterações morfológicas e sua associação com o potencial fisiológico das sementes.

Avaliação do vigor de sementes

A avaliação do vigor de sementes é importante para complementar as informações fornecidas pelo teste de germinação, permitindo estimar o desempenho de sementes sob variação mais ampla das condições de ambiente. Dentre os métodos disponíveis, a determinação do crescimento de plântulas e a germinação sob temperaturas adversas têm sido utilizadas com frequência e proporcionado informações consistentes para diversas espécies cultivadas (MARCOS-FILHO, 2005). Por exemplo, a obtenção de informações sobre a germinação de sementes de cucurbitáceas expostas a temperaturas relativamente baixas (abaixo de 17 °C) é uma das necessidades atuais das empresas produtoras de sementes dessas espécies.

No entanto, embora os testes de vigor proporcionem informações muito úteis para vários segmentos da indústria de sementes, ainda há oportunidades para o aprimoramento de procedimentos, tendo em vista a precisão, objetividade, redução do período necessário para obtenção dos resultados, padronização e confiabilidade dos resultados. Em particular, a interpretação de alguns dos testes que se baseiam no desempenho de plântulas é relativamente subjetiva e influenciada pela sensibilidade do analista.

Uma das possibilidades potenciais para conferir maior rapidez e consistência às informações obtidas é o uso da análise computadorizada de

imagens. Várias alternativas foram desenvolvidas, provavelmente a partir de trabalhos conduzidos por McCORMAC et al. (1990), com sementes de alface, que propuseram um método automatizado para avaliação do vigor, tomando como base o comprimento da raiz primária.

Mais recentemente, SAKO et al. (2001) desenvolveram uma metodologia para captar imagens de plântulas e efetuar determinações simultâneas do comprimento do hipocótilo, da raiz primária, da plântula inteira e da relação raiz/hipocótilo, durante a germinação de sementes de alface. Desta maneira, após o processamento das imagens em computador, com o uso de software específico, obtiveram informações sobre o vigor, considerando, também, a velocidade e a uniformidade de desenvolvimento; esse procedimento também foi adotado com sucesso por HOFFMASTER et al., (2003) e por MARCOS-FILHO et al. (2006), para sementes de soja e melão, respectivamente.

O aprimoramento desse sistema para análise de imagens de sementes de abóboras poderá constituir alternativa eficiente para determinar o potencial fisiológico das sementes, pois os procedimentos são relativamente simples, rápidos e econômicos, podendo ser reproduzidos sem interferência humana, o que representa importante iniciativa em direção à padronização e importante contribuição para o avanço da pesquisa em tecnologia de sementes.

Referências Bibliográficas

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Agricultural Production, Primary Crops 2012**. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 16 jan. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMERCIO DE SEMENTES E MUDAS – ABCSEM. **Dados da Cadeia Produtiva de Hortaliças** - Frente Parlamentar Hortifrutiflorgranjeiros - 2011. Disponível em: <abcsem.com.br>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**,

Brasília, v.12, p.118-124, 1994.

BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G.; NEITZKE, R.S.; GARRASTAZÚ, M.C.; SCHWENGBER JE. **Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado - período de 2002 a 2006**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Documento, 176. 2006. 30 p.

BARROS, A.S.R. **Maduração e colheita de sementes**. In: MARCOS-FILHO, J.;CICERO, S.M.; SILVA, W.R. Org. Atualização em produção de sementes. Fundação Cargill, 1986, p.107-34.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed**: Physiology of development and germination. 2ed. Plenum Press, New York, 1994. 445 p.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHENER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 127-132, 1993.

CARVALHO, M.L.M.; AELST, A.C.; ECK, J.W.; HOEKSTRA, F.A. Pre-harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, v.9, p.227-236, 1999.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CASTRO, C.J.; NASCIMENTO, W.M.; CARMONA, R. Efeito da idade e do armazenamento dos frutos na qualidade fisiológica de sementes híbridas de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p. 1-4, 2002.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D. Induction of desiccation tolerance in seeds. In: Workshop on Improved Methods for Handling and Storage of Intermediate/Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds, 1995, Humlebaek, Denmark. **Proceedings...** Humlebaek: [s.n.], p. 127-135. 1996.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, p.501–523. 2006.

GALAU, G. A; BIJAISORADA, T. N.; HUGRHES, D. W. Accumulation kinetic of cotton late embryogenesis-abundant (LEA) mRNAs and storage protein mRNAs: coordinate regulation during embriogenesis and the role of abscisic acid. **Developmental Biology**, v.123, p.198-212, 1987.

HAN, B.; HUGHES, W.; GALAU, G.A.; BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R. Changes in late-embryogenesis - abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. **Planta**, v. 201, p.27-35, 1997.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, p. 141- 153, 1993.

HOEKSTRA, F.A.; WOLKERS, W.F.; BUITINK, J.; GOLOVINA, E.A. Desiccation Tolerance and Long Term Structural Stability. In: International Workshop on Seeds: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, p. 1-12. 1996.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6. p. 431– 438. 2001.

HOFFMASTER, A.L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. An automated system for vigor testing three-day-old soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, v.31, p. 701-713, 2003.

HÖFFS, A.; SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A. Efeito da qualidade fisiológica das sementes e da densidade de semeadura sobre o rendimento de grãos e qualidade industrial em arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, p. 55-62. 2004.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 42, p. 107-113. 2005.

MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M.A.; MCDONALD, M.B.; EVANS, A.E.; GRASSBAUGH, E.M. Assessment of melon seed vigor by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 507-519, 2006.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MENEZES, N.L.; CÍCERO, S.M.; VILLELA, F.A. Identificação de fissuras em sementes de arroz após a secagem artificial, por meio de raios-X. **Ciência Rural** 35: 1194-1196, 2005.

McCORMAC, A.C.; KEEFE, P.D.; DRAPER, S.R. Automated vigor testing of field vegetables using image analysis. **Seed Science and Technology**, v.18, p.103-112, 1990.

McDONALD, M.B. Seed Deterioration: Physiology repair and assessment. **Seed Science and Tecnology**, v.22, p.531-539,1999.

NASCIMENTO, W.M.; PESSOA, H.B.S.V.; SILVA, P.P. Produção de sementes híbridas de abóbora do tipo tetsukabuto. **PALESTRA**. XI Curso Sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças - Porto Alegre/RS - 16 a 18 de novembro de 2011.

NASCIMENTO, W.M.; LIMA, L.B.; ALVARES, M.C. Maturação de sementes híbridas de berinjela. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.1040-1041, 2000. (Suplemento).

PEDROSA, J.F.; FERREIRA, F. A.; CASALI, V. W. Abóbora, morangas e abobrinhas: cultivares e métodos culturais. **Informe Agropecuário**, v.8, p.24-26, 1982.

PEDROSA, J.F.; OLIVEIRA, G.M.; NETO, F.B.; MONTEIRO, R.F. Influência da idade e armazenamento do fruto na produção e qualidade de sementes de *Cucurbita maxima x moschata*. **Horticultura Brasileira**, v. 5, p. 15-17, 1987.

PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SÁNCHEZ, R. A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1074, p. 277-283, 1991.

ROSA, S.D.V.F.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; VEIGA, R.D. Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, p. 290-310, 2004.

SAKO, Y.; MCDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A. F.; BENNETT, M.A. A system of automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v 29, p. 625-636, 2001.

SANJUR, O. I.; PIPERNO, D. R.; ANDRES, T. C.; WESSEL-BEAVER, L. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 99, p. 535–540, 2002.

SUN, W. Q.; LEOPOLD, A. C. The glassy state and accelerated ageing of soybeans. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p.767-774, 1993.

WHITAKER, T.W., ROBINSON, R.W. Squash breeding. In: BASSETT, M.J. (Ed.). **Breeding vegetable crops**. Westport, Connecticut : Avi, 1986. p.209-242. 584p.

Capítulo I

Análise fisiológica de sementes híbridas de abóbora durante o desenvolvimento

Resumo

A Embrapa Hortaliças desenvolveu no ano de 1992 um híbrido F1 interespecífico de abóbora ('Jabras'), resultante do cruzamento entre uma linhagem de *Cucurbita maxima* Duch. (progenitor feminino) e *Cucurbita moschata* Duch (progenitor masculino), tendo como características maior precocidade e frutos mais uniformes, quando comparados aos cultivares regionais de polinização aberta. Um fator de grande importância no processo de produção de sementes de abóbora híbrida é a determinação do ponto de maturidade fisiológica da semente. Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar a melhor época para a realização da colheita e verificar o efeito do armazenamento dos frutos na qualidade fisiológica de sementes do híbrido de abóbora 'Jabras'. Os frutos foram colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA). Em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo que quinze frutos tiveram suas sementes extraídas imediatamente após a colheita e os outros quinze frutos foram armazenados por vinte dias em caixas plásticas vazadas e, somente este período, tiveram suas sementes extraídas. Avaliou-se a qualidade das sementes através do grau de umidade, germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência, massa de 1000 sementes e massa seca de plântulas. Foi observado que a maturidade fisiológica das sementes ocorreu em sementes oriundas de frutos colhidos aos 60 dias após a antese e armazenados por 20 dias. Nesse período, as sementes encontravam-se com o máximo de matéria seca, máxima germinação e vigor, e redução significativa do teor de água.

Palavras chaves: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, qualidade das sementes.

Abstract

Physiological analysis of pumpkin hybrid seeds during development

Embrapa Vegetables developed in 1992 a interspecific F1 hybrid pumpkin ('Jabras'), resulting from a cross between *Cucurbita maxima* Duch (female parent) and *Cucurbita moschata* Duch (male parent), having features as higher early and more uniform fruit when compared to regional open-pollinated cultivars. A major factor in the squash hybrid seed production hybrid process is to determine the seed physiological maturation. Thus, this study aimed to evaluate the best time to fruit harvest and to verify the effect of fruit storage on the physiological seed quality 'Jabras' squash. Fruits were harvested at 15, 30, 45, 60 and 75 days after anthesis (DAA). In every age, thirty fruits were harvested, and fifteen had their fruit seeds extracted immediately after harvesting and the other fifteen fruits were stored for twenty days in plastic boxes; only after this, seeds were extracted. The seed quality was evaluated by moisture content, germination, first count, germination rate, seedling emergency, emergency rate, weight of 1000 seeds and seedling dry matter. It was observed that the physiological maturity of seeds occurred in seeds from fruits harvested at 60 days after anthesis and stored for 20 days. During this period, seeds had dry weight, maximum germination and vigor, and a significant reduction of moisture content.

Keywords: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, seed quality.

Introdução

A Embrapa Hortaliças desenvolveu em 1992 um híbrido F1 interespecífico de abóbora ('Jabras'), com tecnologia nacional, com a finalidade de disponibilizar ao mercado um produto semelhante ao híbrido importado. É um híbrido resultante do cruzamento entre uma linhagem *Cucurbita maxima* Duch (progenitor feminino) e *Cucurbita moschata* Duch (progenitor masculino), tendo como características uma maior precocidade e frutos mais uniformes, quando comparados às cultivares regionais de polinização aberta (NASCIMENTO et al., 2011).

Um fator de grande importância no processo de produção de sementes deste híbrido é determinar o ponto de maturidade fisiológica da semente para evitar manejos incorretos que possam prejudicar sua qualidade, já que nem sempre há necessidade da completa maturação do fruto no campo; sabe-se que, após a colheita dos frutos e um posterior período de armazenamento, as sementes imaturas podem completar seu desenvolvimento atingindo índices máximos de germinação e vigor.

O processo de maturação da semente é resultado de um conjunto de transformações que ocorrem desde o momento em que o óvulo é fertilizado até o momento em que a semente atinge o ponto de máxima potencialidade para desempenhar suas funções vitais (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). É um processo controlado geneticamente e que envolve diversas alterações de natureza fisiológica e bioquímica, desde a fecundação até que as sementes se tornem independentes da planta - mãe e possam, a partir daí, germinar e originar uma nova planta (MARCOS-FILHO, 2005).

A maturidade fisiológica da semente está intimamente relacionada com o momento ideal de colheita, promovendo a preservação da sua qualidade fisiológica após a colheita. Assim, a obtenção de sementes com elevada qualidade fisiológica depende da identificação precisa do momento ideal da colheita, o qual corresponde, frequentemente, à época em que a maturidade fisiológica é atingida, coincidindo também com o momento de máximo acúmulo de massa seca, elevado vigor e alto potencial de germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A qualidade da semente é um aspecto de grande importância dentro do processo produtivo de qualquer cultura (CARDOSO, 2003). Afinal, o sucesso da produção dependerá, dentre outros aspectos, de um adequado estabelecimento das plântulas no campo, fator este diretamente relacionado com a qualidade das sementes. Sementes de baixa qualidade tendem a originar estandes desuniformes, com falhas na emergência de plântulas que comprometem não apenas a produtividade como também a qualidade e padronização do produto colhido.

Desta forma, identificar o ponto de maturidade fisiológica para determinar o momento correto de colheita dos frutos e extração das sementes é de extrema importância no estabelecimento de sistemas eficientes de

produção comercial de sementes. A permanência desnecessária dos frutos em condições de campo, por exemplo, resulta na deterioração progressiva das sementes, influenciada pelas condições ambientais (POPINIGIS, 1985). Na maturação de sementes de frutos carnosos, incluindo as cucurbitáceas, uma característica de destaque é a continuação do processo de maturação mesmo após a colheita dos frutos (VIDIGAL et al., 2006). Sementes provenientes de frutos carnosos imaturos podem apresentar qualidade fisiológica comparável às sementes de frutos maduros, desde que aqueles sejam convenientemente armazenados (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A possibilidade de realização de colheitas antecipadas, com posterior armazenamento, pode ser uma alternativa interessante para o produtor de sementes de cucurbitáceas (BARBEDO et al., 1994). Esse assunto tem sido bastante estudado em sementes oriundas de frutos carnosos, como em abóbora (ARAÚJO et al., 1982), melancia (ALVARENGA et al., 1984), pepino (BARBEDO et al., 1999) e melão (LIMA e NASCIMENTO, 2003), dentre outros. No caso particular de abóbora híbrida, existem relatos indicando que o armazenamento dos frutos é imprescindível para assegurar a qualidade fisiológica das sementes (COSTA et al., 2006).

Desta forma, diante do que foi exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a melhor época para a realização da colheita e verificar o efeito de armazenamento dos frutos na qualidade fisiológica de sementes do híbrido de abóbora 'Jabras'.

Material e Métodos

Sementes de abóbora híbrida, decorrente do cruzamento entre *Cucurbita maxima* (linhagem feminina) e *Cucurbita moschata* (linhagem masculina), foram produzidas em telados no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, no período de maio a outubro de 2012. Empregou-se polinização manual, realizada nas primeiras horas do dia, seguida da etiquetagem das flores polinizadas, com uma proporção média de uma flor masculina para três flores femininas (Figura 1).



Figura 1. Vista parcial do experimento em telado (esquerda) e flor feminina de abobora etiquetada após a polinização manual (direita).

As colheitas dos frutos foram realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA). Em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo que quinze frutos foram armazenados por vinte dias em caixas plásticas vazadas, em local arejado (Figura 2). Os frutos restantes tiveram suas sementes extraídas imediatamente após a colheita, utilizando cal hidratada para remoção da mucilagem. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente por 24 horas. Na etapa seguinte, as sementes foram transferidas para uma câmara com ventilação e temperatura de 32 °C por 48 horas (Figura 3). As sementes secas foram então beneficiadas em soprador pneumático. O mesmo procedimento foi realizado com as sementes oriundas dos frutos armazenados. As sementes foram submetidas às seguintes análises:



Figura 2. Armazenamento de frutos em caixas plásticas vazadas, por 20 dias.



Figura 3. Extração de sementes (esquerda, acima); Lavagem das sementes utilizando cal hidratada para remoção da mucilagem (direita, acima); Secagem das sementes à temperatura ambiente por 24 horas (esquerda, abaixo) e secagem das sementes em câmara com ventilação e temperatura de 32 °C por 48 horas (direita, abaixo).

Determinação do grau de umidade: foi utilizado o método da estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizados aproximadamente 2g de sementes em cada recipiente, com duas repetições para cada tratamento. O teste foi realizado antes e depois da secagem.

Germinação: conduzida com quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, em rolo de papel para germinação, tipo “germitest”, umedecido com água destilada na proporção de 2,0 vezes a massa do papel seco, em germinador com temperatura alternada de 20°C (16h, escuro) e 30°C (8h, luz). Foi realizada uma contagem aos oito dias após a instalação do teste e as avaliações efetuadas conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Primeira contagem: esta análise foi realizada conjuntamente com o teste de germinação, contabilizando-se o número de plântulas normais presentes no quarto dia após o início do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Tempo médio de germinação: obtido através de contagens diárias das sementes germinadas até o oitavo dia após a semeadura e calculado através da fórmula abaixo, proposta por LABOURIAU, (1983), sendo os resultados expressos em dias.

$$\text{TMG} = \Sigma (n_i t_i) / \Sigma n_i$$
, em que:

TMG = tempo médio de germinação (dias)

n_i = número de sementes germinadas no intervalo entre cada contagem;

t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i -ésima contagem.

Emergência de plântulas em casa de vegetação: foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes de cada tratamento, as quais foram semeadas em bandejas multicelulares de poliestireno expandido com 200 células, contendo substrato comercial. A irrigação foi realizada diariamente. A avaliação foi realizada aos 15 dias após a semeadura, e os resultados foram expressos em porcentagem.

Tempo médio de emergência: obtido através de contagens diárias das sementes germinadas até

a estabilização da germinação, ou seja, 15 dias após a semeadura.

após a semeadura e calculado através da fórmula abaixo, proposta por LABOURIAU, (1983), sendo os resultados expressos em dias.

$TMG = \sum (n_i t_i) / \sum n_i$, em que:

TMG = tempo médio de germinação (dias)

n_i = número de sementes germinadas no intervalo entre cada contagem;

t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i-ésima contagem.

Massa de 1000 sementes: oito subamostras de 100 sementes secas de cada tratamento foram pesadas, sendo a média dos resultados expressos em gramas (g) (BRASIL, 2009).

Massa seca de plântulas: realizada em plântulas obtidas aos 20 dias após a emergência, sendo utilizadas 50 plântulas (parte aérea) divididas em 4 repetições. As amostras foram acondicionadas em envelopes de papel pardo que foram pesados, identificados e secos em estufa (65 °C) por um período de 48 horas. Após esse período, foram mantidas em dessecador por 15 minutos, determinando-se a massa seca em balança de precisão, em mg plântula⁻¹.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, em arranjo bifatorial 5 x 2 (cinco épocas de colheita e dois períodos de armazenamento dos frutos). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação de médias efetuada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Após a análise de variância, foi realizada a análise de regressão pelo procedimento PROC REG do programa computacional SAS (SAS 9.1.3, 2000-2004).

Resultados e Discussão

O teor de água das sementes decresceu continuamente à medida que aumentou a idade dos frutos. Para os frutos não armazenados, o teor de água foi de 84% nas sementes extraídas dos frutos aos 15 DAA e 45% naquelas extraídas dos frutos aos 75 DAA. Já para os frutos armazenados por 20 dias, o teor de água foi de 76% nas sementes extraídas dos frutos aos 15 DAA e 40% naquelas extraídas dos frutos aos 75 DAA (Figura 4). Esta umidade é considerada elevada, havendo a necessidade de secagem rápida para evitar

possível fermentação e formação de produtos que acarretem danos imediatos a qualidade das sementes (MARCOS-FILHO, 2005). Após a secagem, as sementes apresentaram uma umidade que variou entre 6 e 9%. Vale salientar que a umidade recomendada para armazenamento das sementes de abóbora em embalagens impermeáveis é de 6% (NASCIMENTO et al., 2008).

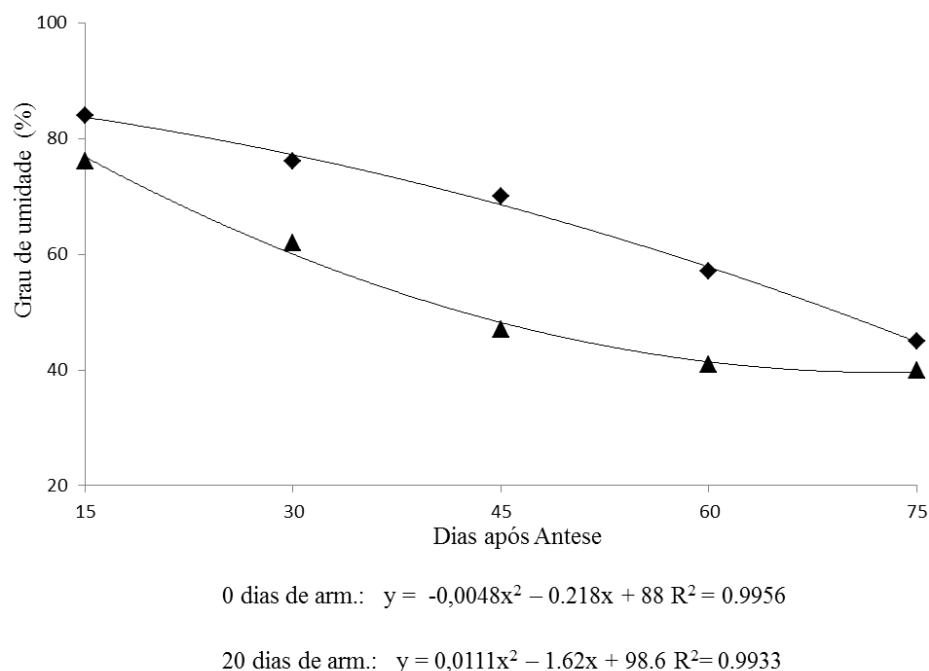


Figura 4. Grau de umidade de sementes híbridas de abóbora, antes da secagem, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Resultados semelhantes foram verificados por outros autores em frutos carnosos, como ALVARENGA et al. (1991), com abóbora italiana, cujo teor de água das sementes decresceu de 89% para 42% ao longo do período de colheita. Já em sementes de pimenta, VIDIGAL (2008) constatou que o teor de água das sementes variou de 96% aos 20 DAA a 46% aos 70 DAA, momento em que a semente atingiu a maturidade fisiológica. Nas espécies de frutos carnosos, ocorre equilíbrio osmótico entre o pericarpo, rico em solutos, e as sementes, resultando na estabilização do teor de água destas ao final da

maturação. Embora seja utilizado na determinação da maturidade fisiológica, o teor de água das sementes não é um indicador adequado, por sofrer influências ambientais e genéticas (WELBAUM e BRADFORD, 1988).

O alto grau de umidade inicial, verificado nas sementes das primeiras colheitas, e seu posterior decréscimo está relacionado com a importância da água nos processos de enchimento e maturação das sementes. Para que os produtos fotossintetizados nas folhas sejam depositados na semente em formação, como material de construção e, posteriormente, reserva, é necessário que esta umidade se mantenha elevada, o que ocorre até o máximo acúmulo de matéria seca, quando então se inicia uma rápida desidratação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Diferenças significativas também foram verificadas entre as épocas de colheita com relação à germinação das sementes nos frutos armazenados por 20 dias. A germinação das sementes foi crescente, observando-se certa estabilidade entre 60 e 75 DAA, sendo esse período considerado como uma possível indicação da maturidade fisiológica das sementes, que atingiram a máxima germinação (97%) aos 75 DAA (Figura 5).

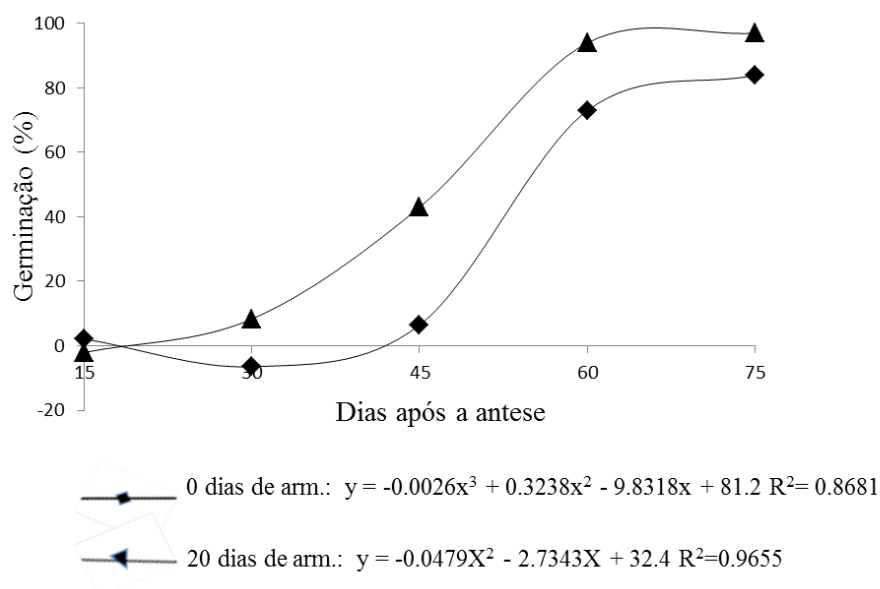


Figura 5. Germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Constatou-se que as sementes oriundas de frutos armazenados por 20 dias apresentaram uma maior germinação quando comparadas com aquelas sementes extraídas imediatamente após a colheita dos frutos (Figura 5). É importante ressaltar que o armazenamento por 20 dias dos frutos colhidos aos 75 DAA foi suficiente para elevar a germinação de 84% para 97%. Resultados similares foram obtidos por VIDIGAL et al. (2009) em sementes de pimenta, onde foi observada melhor qualidade fisiológica nas sementes obtidas de frutos colhidos aos 75 DAA e armazenados por sete dias.

Geralmente, o ponto de colheita depende da maturidade fisiológica da semente, o que, em muitos casos, coincide com a máxima acumulação de matéria seca e, quando as sementes alcançam essa fase, geralmente, seu potencial para germinação e vigor se eleva (DUARTE e CARNEIRO, 2009).

A percentagem de sementes aptas a germinarem é crescente durante o processo de maturação, chegando ao nível máximo em época próxima à paralisação do fluxo de fotossintetizados da planta para a semente. As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação, atingindo o máximo em época muito próxima ou coincidente com o máximo acúmulo de reservas (MARCOS-FILHO, 2005).

O vigor das sementes, determinado pelo teste de primeira contagem e índice de velocidade de germinação, apresentou crescimento com a idade dos frutos e com o armazenamento dos mesmos (Figuras 6 e 7). Nestes dois testes foi observado acréscimo no vigor das sementes obtidas de frutos colhidos aos 60 DAA e armazenados por 20 dias, estabilizando-se a partir daí. Comportamento semelhante foi observado por BARBEDO et al. (1997) em sementes de pepino. Em sementes de abóbora italiana, o armazenamento por nove dias de frutos colhidos aos 55, 65 e 75 DAA também foi benéfico ao vigor, avaliado pela primeira contagem de germinação (ALVARENGA et al., 1991).

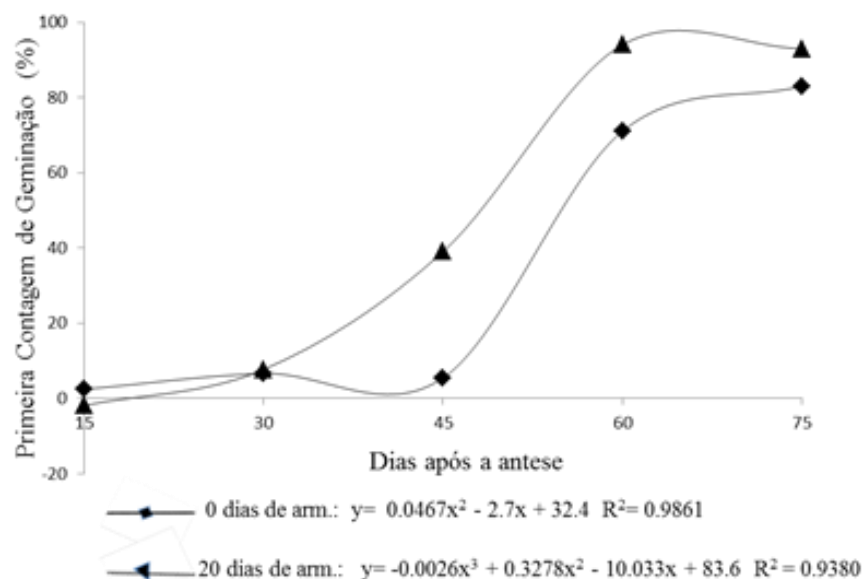


Figura 6. Primeira contagem de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese e armazenados por 0 e 20 dias.

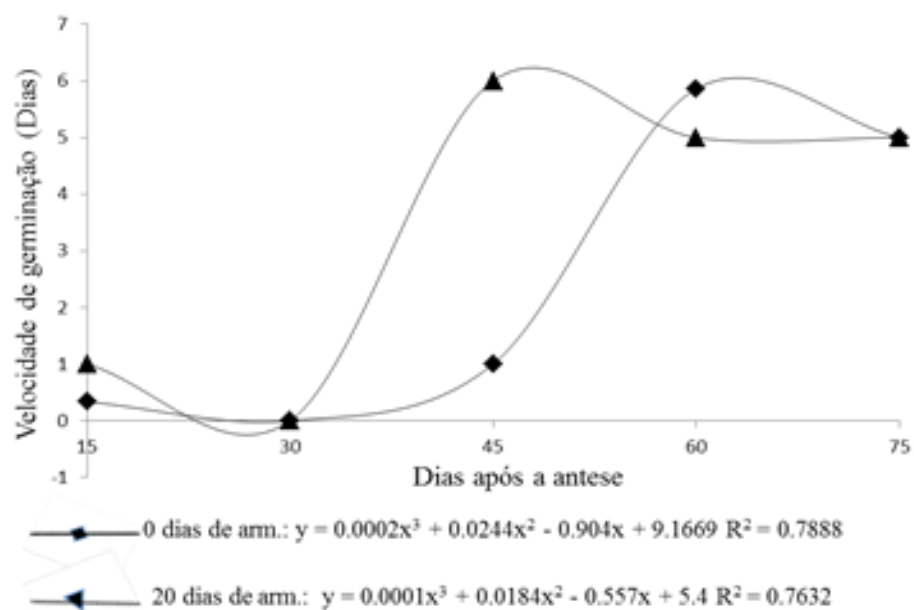


Figura 7. Velocidade de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Em sementes de pimentão, observou-se aumento do vigor das sementes com a elevação da idade dos frutos, indicando que as sementes extraídas de frutos mais maduros possuem alto potencial de longevidade e elevada capacidade para gerar plantas perfeitas e vigorosas (OLIVEIRA et al., 1999).

Também foi observado incremento da emergência de plântulas em casa de vegetação e do índice de velocidade de emergência com o avanço da idade dos frutos e com o armazenamento dos mesmos (Figuras 8 e 9). A emergência de plântulas foi de 94% nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 45 DAA e armazenados por 20 dias e 97% nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 60 DAA e armazenados por 20 dias. Já a velocidade de emergência revelou que para que as sementes expressem sua máxima capacidade de germinação há a necessidade de cinco dias a mais, desde que os frutos sejam armazenados por 20 dias, sugerindo que as sementes obtidas de frutos colhidos com esta idade já atingiram a maturidade fisiológica.

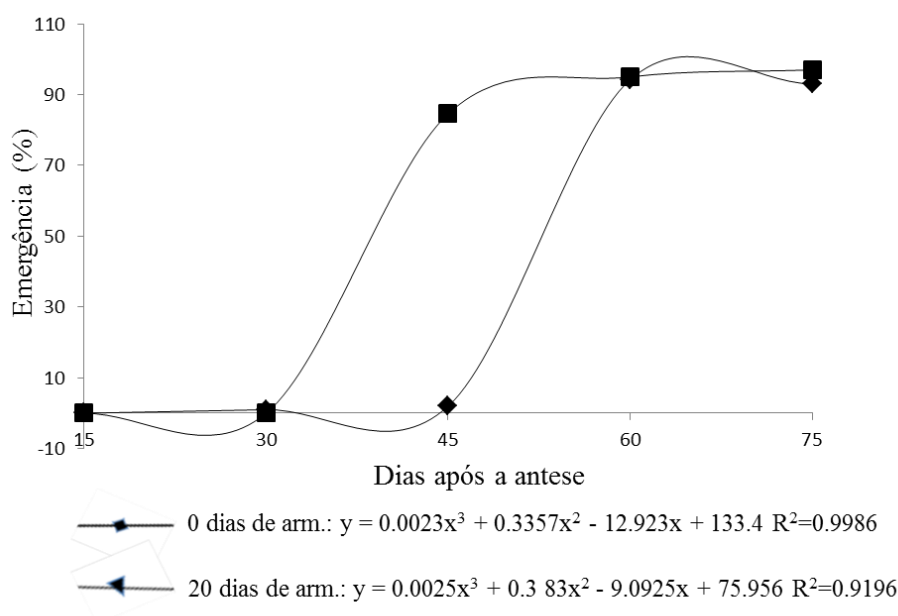


Figura 8. Emergência de plântulas em casa de vegetação provenientes de sementes híbridas de abóbora, obtidas a partir de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

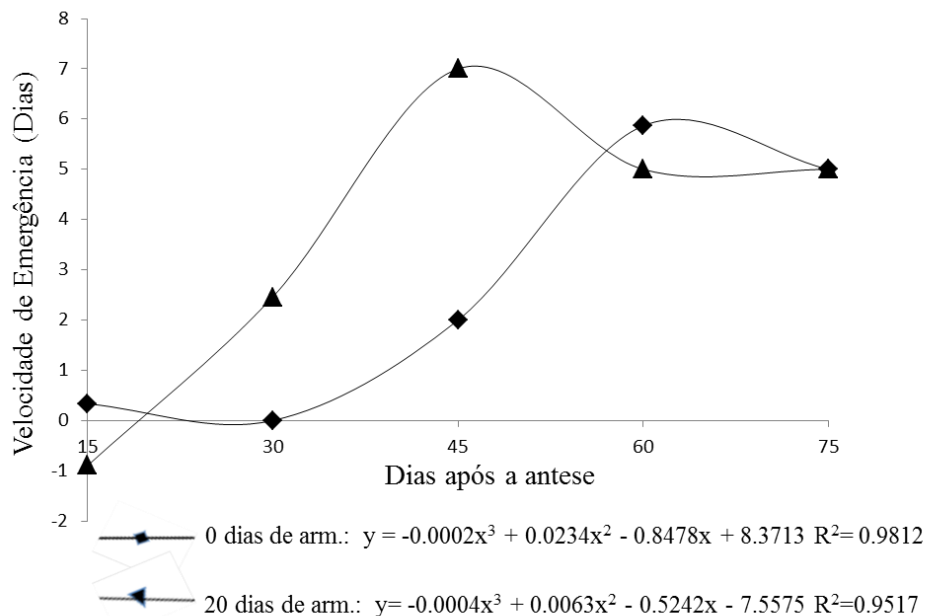


Figura 9. Velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação provenientes de sementes híbridas de abóbora, obtidas a partir de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos para a massa de mil sementes, que foram máximos para as sementes oriundas de frutos colhidos aos 75 DAA e armazenados por 20 dias, com média de 21,53g. Observou-se que as sementes provenientes de frutos armazenados apresentaram resultados superiores quando comparados com as sementes provenientes dos frutos não armazenados ao longo das épocas de colheita. O tamanho da semente é um dos fatores que podem influenciar a germinação e o vigor das plântulas. As sementes de maior tamanho normalmente possuem embriões bem formados e com maiores quantidade de reservas sendo, potencialmente, as mais vigorosas, bem como, maior potencial de sobrevivência (Carvalho & Nakagawa, 2000). Para a massa seca das plântulas, observou-se crescimento de acordo com a idade dos frutos, sendo que as sementes provenientes de frutos colhidos entre 60 e 75 DAA, armazenados ou não, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes (Figura 11).

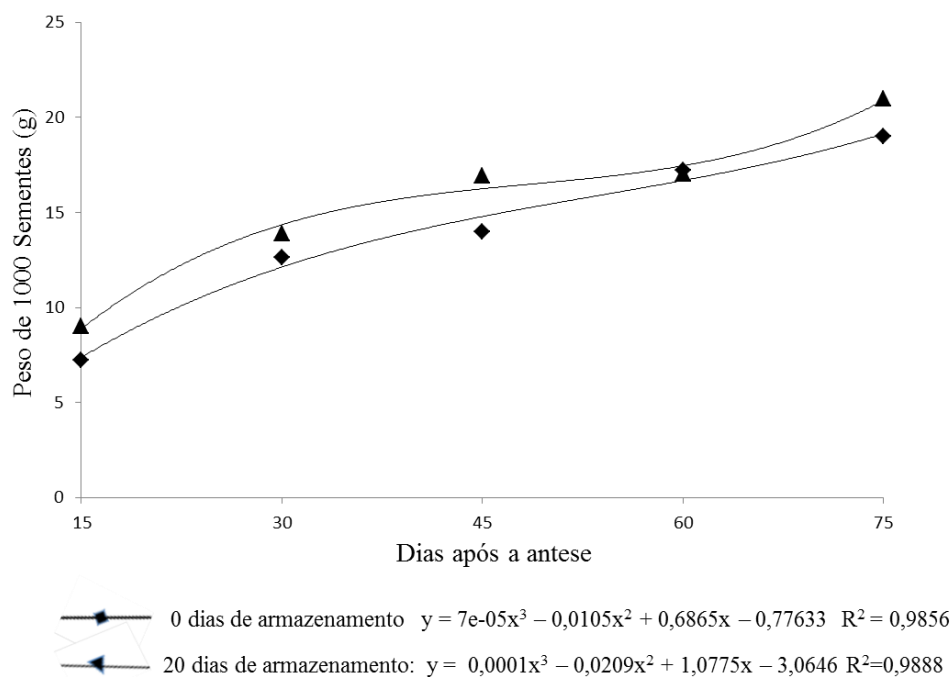


Figura 10. Massa de 1000 sementes determinada em sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

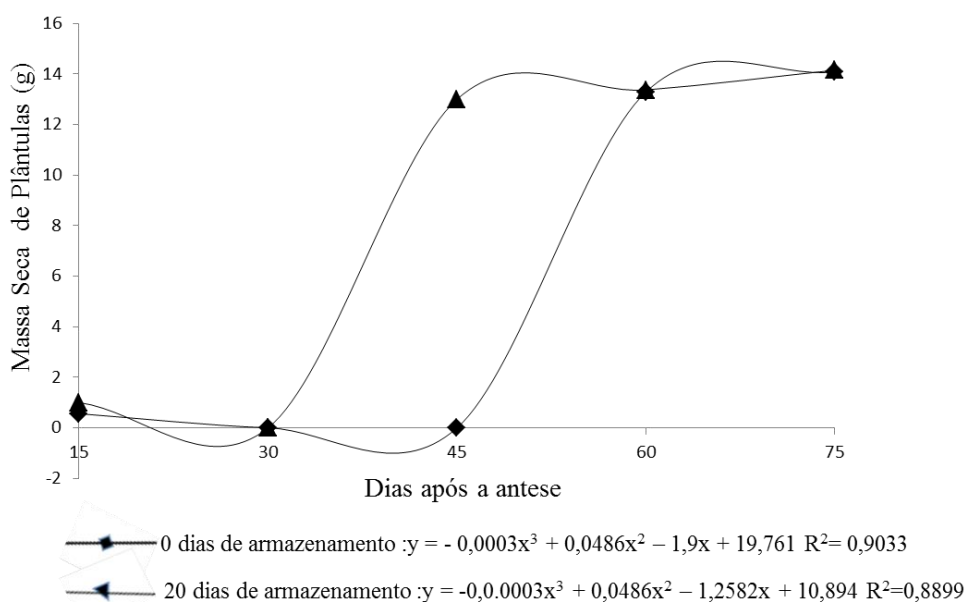


Figura 11. Massa seca de plântulas de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

As sementes oriundas de frutos a partir dos 60 DAA encontram-se bem formadas e com elevada qualidade fisiológica, conforme observado nos resultados de germinação, vigor e massa de 1000 sementes (Figuras 5, 6 e 10). De acordo com MONDO et al. (2012), as plântulas originadas de sementes de alto potencial fisiológico apresentam maior eficiência na produção de biomassa seca, sendo as diferenças reduzidas com o desenvolvimento das plantas. Tais resultados são condizentes com os encontrados no presente trabalho.

Assim, o encerramento do processo de desenvolvimento da semente baliza os procedimentos mais adequados para a obtenção de sementes com alta qualidade. É inegável que o máximo potencial fisiológico da semente é alcançado quase que simultaneamente à maturidade (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000)

O conjunto dos atributos avaliados permitiu verificar que a maturidade fisiológica das sementes de 'Jabras' teve início a partir dos 60 DAA, sendo que as sementes provenientes de frutos armazenados por 20 dias apresentaram qualidade fisiológica superior. Nesses períodos, as sementes atingiram o máximo de matéria seca e máxima germinação e vigor, e reduzido teor de água das sementes, o que é fundamental para a preservação da sua qualidade.

Outro aspecto importante é que, neste ponto, as sementes produzidas conseguiram atender aos padrões comerciais de sementes de abóbora (Germinação = 75%), estabelecidos pela Portaria Ministerial nº 457, de 18/12/1986 (Brasil, 1986).

Referências Bibliográficas

ALVARENGA, E.M.; SILVA, R.F.; ARAÚJO, E.F.; LEIRO, L.S. Maturação fisiológica de sementes de abóbora italiana. **Revista Brasileira de Sementes**, v.13, p.147-150, 1991.

ALVARENGA, E.M.; SILVA, R.F.; ARAÚJO, E.F.; CARDOSO, A.A. Influência da idade e armazenamento pós-colheita dos frutos na qualidade de sementes de melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 2, p. 5-8, 1984.

ARAÚJO, E.F.; MANTOVANI, E.C.; SILVA, R.F. Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 4, p. 77-87, 1982.

BARBEDO, C.J.; BARBEDO, A.S.C.; NAKAGAWA, J.; SATO, O. Efeito da idade e do repouso pós-colheita de frutos de pepino na semente armazenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.839-847, 1999.

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.14-18, 1994.

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Qualidade fisiológica de sementes de pepino cv. Pérola, em função da idade e do tempo de repouso pós-colheita dos frutos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.905-913, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no. 457, de 18 de dezembro de 1986. (Estabelece os padrões de sementes olerícolas para distribuição,...). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 19653, 23 dez. 1986. 395p.

CARDOSO, A.I.I. Produção e qualidade de sementes de abobrinha 'Piramoita' em resposta à quantidade de pólen. **Bragantia**, v.62, p.47-52, 2003.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

COSTA, C.J.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W.M. Idade e tempo de armazenamento de frutos e qualidade fisiológica de sementes de abóbora híbrida. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p. 127-132, 2006.

DUARTE, E.F.; CARNEIRO, I.F. Qualidade fisiológica de sementes de *Dyckia Goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae) em função do estágio de maturação dos frutos. **Bioscience Journal**, v. 25, p. 161-171, 2009.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LIMA, G.P.; NASCIMENTO, W.M. Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de melão cv. Eldorado 300. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p.398, 2003. (Suplemento).

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M.; DURVAL DOURADO-NETO, D.; PUPIM, T. L.; DIAS, M.A.N. Vigor de sementes e desempenho de plantas de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 143 - 155, 2012.

NASCIMENTO, W.M.; PESSOA, H.B.S.V.; SILVA, P.P. **Produção de sementes híbridas de abóbora do tipo tetsukabuto**. Palestra XI Curso Sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças. 8.ed. Porto Alegre: 2011. CD-ROM.

NASCIMENTO, W.M.; FREITAS, R.A.; CRODA, M.D. **Conservação de sementes de hortaliças na agricultura familiar**. Brasília: Comunicado Técnico 54, 2008. p. 1-5.

OLIVEIRA, A.P.; CARLOS, P.; GONÇALVES, C.P.; BRUNO, R.L. A; ALVES, E. E. U. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função de idade de frutos após a antese. **Revista Brasileira de Sementes**, v 21, p.88-94, 1999.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; NAVEIRA, D.S.P.; ROCHA, F.B.; BHERING, M.C. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p.87-93, 2006.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; PINHO, E.V.R.; DIAS, L.A.S. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, p.129-136, 2009.

VIDIGAL, D.S.; LIMA, J.S.; BHERING, M.C; DIAS, D.C.F.S. Teste de condutividade elétrica para sementes de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.168-174, 2008.

WELBAUM, G. E.; BRADFORD, K .J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). In. Water relations of seeds and fruit development. **Plant Physiology**, v.86, p.406-411, 1988.

Capítulo II

Alterações bioquímicas em sementes híbridas de abóbora em diferentes estádios de maturação

¹Patrícia P. Silva; ¹Antonio C. S. A. Barros; ²Denise C. F. S. Dias; ³Edila Vilela de Resende Von Pinho; ⁴Warley M. Nascimento; ¹Universidade Federal de Pelotas - RS; ²Universidade Federal de Viçosa - MG; ³Universidade Federal de Lavras - MG; ⁴Embrapa Hortaliças;

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar alterações bioquímicas em sementes do híbrido de abóbora 'Jabras', oriundas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação (15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese), sendo que, em cada época, foram colhidos trinta frutos: quinze frutos tiveram suas sementes extraídas imediatamente e os outros quinze frutos foram armazenados por vinte dias em caixas plásticas e, somente após esse período, tiveram suas sementes extraídas. Após o beneficiamento e secagem das sementes, foram realizadas as seguintes determinações: grau de umidade, germinação, primeira contagem, análise do perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor (*Late Embryogenesis Abundant* - LEA) e atividade de enzimas antioxidantes (peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase). Sementes provenientes de frutos colhidos até 30 DAA apresentaram elevada concentração de enzimas antioxidantes e baixa concentração de proteínas LEA, demonstrando que as mesmas encontravam-se imaturas e que a secagem possivelmente provocou danos em suas membranas celulares. Com isso, houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando as sementes a não resistirem aos danos oxidativos causados pela exposição à secagem. Assim, a redução na germinação e no vigor das sementes podem ter sido causadas pela elevada concentração de enzimas antioxidantes e baixa concentração de proteínas LEA.

Palavras Chaves: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, enzimas antioxidantes, germinação, vigor

Abstract

Biochemical changes in pumpkin hybrid seeds at different stages of maturation

The present study aimed to assess biochemical changes in Jabras pumpkin hybrid seeds, from fruits harvested at different maturity stages (15, 30, 45, 60 and 75 days after anthesis). In each stage, were harvested thirty fruits; fifteen fruits had its seeds extracted immediately and the other fifteen fruits were stored for twenty days in plastic boxes, and only after that period had its seeds extracted. After seed processing and drying the following tests were performed: seed moisture content, germination, first count, electrophoretic profile of resistant proteins (Late Embryogenesis Abundant - LEA) and activity of antioxidant enzymes (peroxidase, ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase). Seeds from fruits harvested 30 DAA showed high concentration of antioxidant enzymes and low concentrations of LEA proteins, demonstrating that themselves were immature and that desiccation possibly caused damage in their cell membranes. This led to increased activity of antioxidant enzymes by accumulation of reactive oxygen species (ROS), leading to seed not resist the oxidative damage caused by exposure to drying. Thus, the reduction in germination and seed vigor may have been caused by the high concentration of antioxidant enzymes and low concentrations of LEA proteins.

Keywords: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, Late Embryogenesis Abundant – LEA, antioxidant enzymes.

Introdução

A partir do ponto de maturidade fisiológica da semente, inicia-se o processo de deterioração, que provoca redução do vigor e da viabilidade (TEKRONY et al., 1980). As principais alterações provocadas pela deterioração são a degradação e a inativação das enzimas (DELL'AQUILA, 1994), redução da taxa respiratória (FERGUSON et al., 1990) e perda de integridade das membranas celulares (SUN e LEOPOLD, 1993). As membranas, por serem

constituídas por dupla camada lipídica, são o sítio principal do processo de peroxidação de lipídeos, que levam à produção de radicais livres com desorganização do sistema de membrana e declínio do vigor das sementes (McDONALD, 1999).

Essa degradação é ocasionada pelo estresse oxidativo que segundo VANGRONSVELD e CLIJSTERS (1994), é definido como um conjunto de alterações fisiológicas, ocasionadas pela ação direta ou indireta das 'Espécies Reativas de Oxigênio' (EROs), afetando os processos metabólicos, como a respiração, a fixação do CO₂, as trocas gasosas, entre outros. A produção em excesso de EROs, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical superóxido (O₂) e o radical hidróxilo (HO), pode causar danos às sementes, uma vez que provocam alterações oxidativas nas células (MOLLER et al., 2007) e aumentam a porcentagem de mutações nas mesmas (TAIZ e ZEIGER, 1998).

As células, no entanto, apresentam complexo sistema de defesa para proteção contra os danos causados pelos radicais livres, envolvendo um conjunto de enzimas antioxidantes, que catalisam reações de formação e regeneração de moléculas para a captura de EROs (MARTINS e MOURATO, 2008). O sistema que forma esses mecanismos enzimáticos é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases como a guaiacol peroxidase (POD), enzimas e metabólitos do ciclo da glutathione ascorbato, como a ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione redutase (GR) (ORT e BAKER, 2002; SOFO et al., 2005).

A enzima superóxido dismutase, presente no citoplasma celular e na matriz mitocondrial, tem como função inicial catalisar a reação de dismutação de radicais superóxidos livres (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (DIONISIO-SESE e TOBITA, 1998; FURIAN et al., 2007). Sua decomposição também é realizada pela catalase, cujas subunidades são formadas no citoplasma e a síntese é completada nos peroxissomos (McDONALD, 1999; WASSMANN et al., 2004). Já as enzimas peroxidases, de modo geral, catalisam a redução do H₂O₂ e peróxidos orgânicos em álcoois (SHAN, 1990). Segundo NAKANO e ASADA (1981), o ascorbato da peroxidase é o doador de elétrons para a retirada de H₂O₂ nos cloroplastos.

As modificações nos perfis dessas enzimas é ferramenta de grande importância no monitoramento das alterações bioquímicas resultantes da

deterioração que podem ocorrer durante a maturação de sementes de abóbora, principalmente na fase final do desenvolvimento das sementes, pois os processos oxidativos tendem a aumentar durante a perda de água (OLIVER e BEWLEY, 1997); essas enzimas têm como função impedir o acúmulo de substâncias tóxicas geradas durante a oxidação.

Além das enzimas, existem também as proteínas resistentes ao calor, como as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Essas proteínas são sintetizadas durante a fase final da secagem natural das sementes. As proteínas LEA são hidrofílicas, estáveis, não se desnaturam sob altas temperaturas, são sintetizadas no início do desenvolvimento das sementes, quando o conteúdo de ácido abscísico (ABA) ainda é alto e durante a fase de secagem rápida que ocorre no final da maturação (GALAU et al., 1987; HAN et al., 1997). Alguns estudos relatam que as proteínas LEA também podem ser acumuladas em resposta a estresse hídrico, baixas temperaturas ou salinidade (HONG-BO et al., 2005).

Os principais estudos relacionados à maturação de sementes de abóbora estão relacionados ao monitoramento das modificações fisiológicas que acontecem durante o processo de maturação, especialmente, estudos envolvendo o conteúdo de massa seca, germinação e vigor das sementes. Ainda são escassas as informações relacionadas às alterações na atividade de enzimas durante o desenvolvimento e maturação das sementes. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de abóbora, cultivar 'Jabras', obtidas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação e submetidas ao armazenamento pós-colheita.

Material e Métodos

A produção de sementes de abóbora híbrida, decorrente do cruzamento entre *Cucurbita maxima* (linhagem feminina) e *Cucurbita moschata* (linhagem masculina), foi realizada em telados no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, no período de maio a outubro de 2012. Utilizou-se a polinização manual nas primeiras horas do dia, seguida da etiquetagem das flores polinizadas.

As colheitas dos frutos foram realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA). Em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo que quinze frutos foram armazenados por vinte dias em caixas plásticas vazadas, em local arejado. Os frutos restantes tiveram suas sementes extraídas imediatamente após a colheita, utilizando cal hidratada para remoção da mucilagem; após a extração, as sementes foram secas e beneficiadas. Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas à determinação do grau de umidade, germinação e primeira contagem de germinação no Laboratório de Sementes da Embrapa Hortaliças.

A análise das proteínas resistentes ao calor LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) foi realizada no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de fevereiro a maio de 2013 e a análise das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato foi realizada no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de junho a agosto de 2013. A metodologia de cada uma dessas análises é descrita a seguir:

Análise de proteínas resistentes ao calor - LEA (*Late Embryogenesis Abundant*): 100 mg de eixos embrionários foram macerados em cadinhos, na presença de nitrogênio líquido, e, em seguida, foi adicionado tampão de extração, descrito por ALFENAS (1998), na proporção de 10 partes de tampão para 1 parte da amostra. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e incubado em banho – maria, a 85 °C por 15 minutos. Em seguida, repetiu-se a centrifugação como mencionado anteriormente. Posteriormente, foram coletados 70 µL do extrato, colocados em microtubos e adicionados 40 µL de tampão de amostra (Tris HCl 50mM pH 7,5). Posteriormente, foi realizado um orifício na tampa de cada microtubo e os mesmos foram colocados em suporte próprio que foi inserido em água fervente durante 5 minutos. Ao final deste período, procedeu-se a corrida eletroforética descrita por ALFENAS (2006). A coloração dos geis foi realizada com emprego de solução de Coomassie Blue 0,05%, por 12 horas (Figura 1), e a descoloração, até a visualização das bandas, com solução de ácido acético 10%, segundo ALFENAS et al.,(1991).



Figura 1. Coloração do gel, na análise de proteínas resistentes ao calor, com a solução de Coomassie Blue.

Análises enzimáticas: inicialmente, foi obtido o extrato enzimático bruto das sementes para a determinação do teor de proteínas e da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato. A obtenção do extrato foi realizada por meio de homogeneização em almofariz de 0,3 g de sementes de cada tratamento em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, suplementado com 50 mg de PVPP (Polivinil Polipirrolidona). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg (aproximadamente 10.000 rpm) por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e reservado em banho de gelo.

1- Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD): a determinação da atividade da SOD levou em consideração a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (azul de cloreto de nitrotetrazólio). A atividade foi determinada pela adição de 50 µL do extrato bruto oriundo de sementes a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 µM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 µM de riboflavina em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, conforme descrito por DEL LONGO et al. (1993). A programação do comprimento de onda do espectrofotômetro Analítica, modelo Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS 10S (Figura 2), foi de 560 nm. A reação iniciou-se com a iluminação dos tubos, em câmara composta por lâmpadas

fluorescentes tubulares (15 W), a 25 °C. Após cinco minutos de incubação as lâmpadas foram desligadas e, assim, paralisada a reação (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os tubos considerados brancos, para a análise, receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, abrigados da luz. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima, necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra.

2- Atividade da enzima Catalase (CAT): A atividade da enzima CAT foi determinada com base no método descrito por PEIXOTO et al. (1999), cuja atividade é definida pela quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição do H_2O_2 . Para o teste, 950 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12,5 mM, foi colocado em cubetas de quartzo e a reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato bruto. A variação da absorção (ΔE) foi calculada pela diferença das leituras a 240 nm, em um intervalo de 80 segundos. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar = $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a determinação da atividade específica levou em consideração a concentração de proteína solúvel da amostra.

3- Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX): Para a análise da atividade da enzima APX, utilizou-se o método descrito por KOSHIBA (1993), com algumas modificações. O mesmo baseou-se na oxidação do 60 ascorbato na reação da atividade peroxidásica da enzima. Inicialmente, foi preparada uma solução de trabalho contendo uma alíquota de 100 μL de extrato bruto com 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 (volume final de 3,0 mL). A esta solução acrescentou-se ascorbato e peróxido de hidrogênio, em concentração final de 0,8 e 1 mM, respectivamente. Determinou-se a variação da absorção por meio de leitura a 290 nm, sendo que a atividade específica da enzima foi calculada a partir de um coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4- Atividade da enzima Peroxidase (POX): Adotou-se o método espectrofotométrico de HAMMERSCHMIDT et al. (1982), no qual é mensurada a oxidação do guaicol na presença de peróxido de hidrogênio, em comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram

expressos em unidades de peroxidase. Cada unidade de peroxidase correspondeu à variação de 0,001 no valor da absorbância, a 470 nm, por minuto de reação, por miligrama de proteína total. **5- Teor de proteínas solúveis totais:** A quantidade de proteínas solúveis nas amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), que consiste no corante Coomassie Brilliant Blue G – 250 ligar-se em cargas negativas da cadeia polipeptídica, cuja reação o converte para a forma azul. A análise foi realizada em triplicatas, utilizando tubo de ensaio com 5 mL do reativo de Bradford, adicionando-se 100 µL do extrato bruto. Em seguida, agitou-se e após 15 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm. Utilizou-se como padrão a solução de albumina de soro bovino (BSA- Sigma) com a qual se obteve a curva padrão para a faixa de concentrações entre 0 e 1 mg mL⁻¹, sendo a concentração de proteínas nas amostras determinada pela interpolação da curva padrão.



Figura 2. Espectrofotômetro Analítica, modelo Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS 10S, utilizado na análise das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato.

Determinação do grau de umidade: adotou-se o método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram colocados aproximadamente 2 g de sementes de cada

tratamento em cada recipiente, com duas repetições. Determinou-se o grau de umidade antes e após a secagem.

Germinação: conduzida com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, em rolo de papel de germinação, tipo “germitest”, umedecido com água destilada, na proporção de 2,0 vezes a massa do papel seco, em germinador com temperatura alternada de 20 °C (16h, escuro) e 30 °C (8h, luz). Foram realizadas contagens aos oito dias após a instalação do teste e as avaliações efetuadas conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Primeira contagem: esta análise foi realizada conjuntamente com o teste de germinação, contabilizando-se o número de plântulas normais presentes no quarto dia após o início do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Análises Estatísticas: Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, em um arranjo bifatorial 5 x 2 (cinco épocas de colheita e dois períodos de armazenamento dos frutos). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação de médias efetuada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Após a análise de variância, foi realizada a análise de regressão pelo procedimento PROC REG do programa computacional SAS (SAS 9.1.3, 2000-2004). A interpretação da análise das proteínas LEA foi baseada na análise visual do gel de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas.

Resultados e Discussão

O perfil eletroforético das proteínas “*Late Embryogenesis Abundant*” - LEA indicou ausência de bandas nos estágios iniciais de maturação das sementes, ou seja, até os 30 DAA sem armazenamento dos frutos (Figura 3). A expressão da proteína teve início nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 30 DAA e armazenados por 20 dias, sendo visível o maior espessamento da mesma na medida em que os estádios de maturação se tornaram mais avançados, apresentando maior atividade no estágio de 75 DAA com 20 dias de armazenamento dos frutos, indicando que, a partir dessa época, as

sementes, provavelmente, adquirem tolerância à secagem, característica que está associada à ocasião em que a maturidade fisiológica é atingida, o que coincide, geralmente, com a máxima qualidade das sementes (BEWLEY e BLACK, 1994).

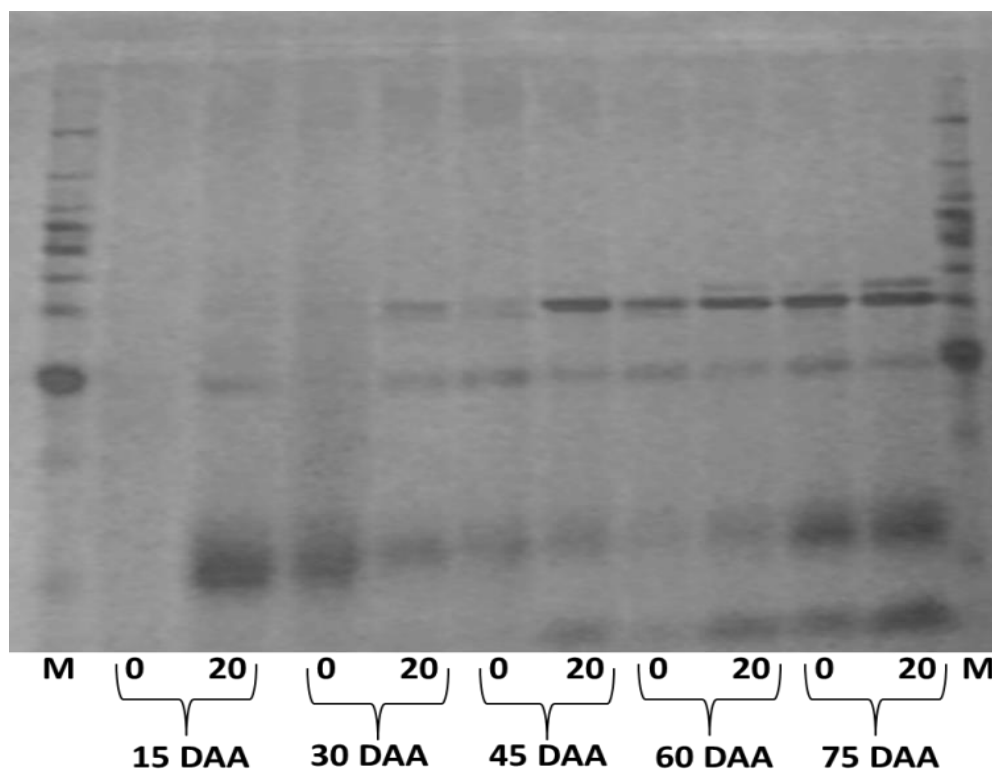


Figura 3. Perfil eletroforético das proteínas LEA em sementes de abóbora híbrida, cultivar Jabras, obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAA e armazenados por 0 e 20 dias.

A baixa atividade das proteínas LEA durante as primeiras fases de maturação das sementes demonstra que, provavelmente, durante essa fase, as sementes se encontravam imaturas e, conseqüentemente, ainda não apresentavam eficiência no seu mecanismo de remoção de radicais livres, promovendo sua baixa qualidade fisiológica. Este resultado confirma os resultados dos testes de germinação e primeira contagem (Figura 4 e 5), quando foi possível verificar melhor qualidade fisiológica das sementes com o avanço da idade. Resultados semelhantes foram observados em sementes de pepino por NAKADA et al. (2011), em que se observou maior expressão das

proteínas LEA em sementes que apresentavam maior maturação fisiológica. A análise do padrão eletroforético da banda dessas proteínas pode facilitar a detecção da maturidade fisiológica em tempo hábil. Em soja, SILVA (2006) afirma que a síntese de proteínas resistentes ao calor está diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes. Segundo FARIA et al. (2004), observa-se ausência de proteínas LEA nas fases iniciais do desenvolvimento de sementes de milho.

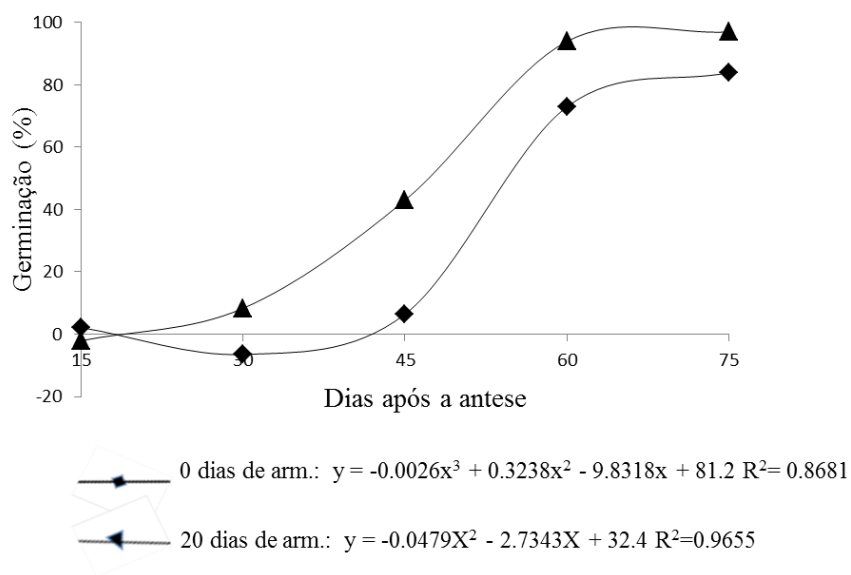


Figura 4. Germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

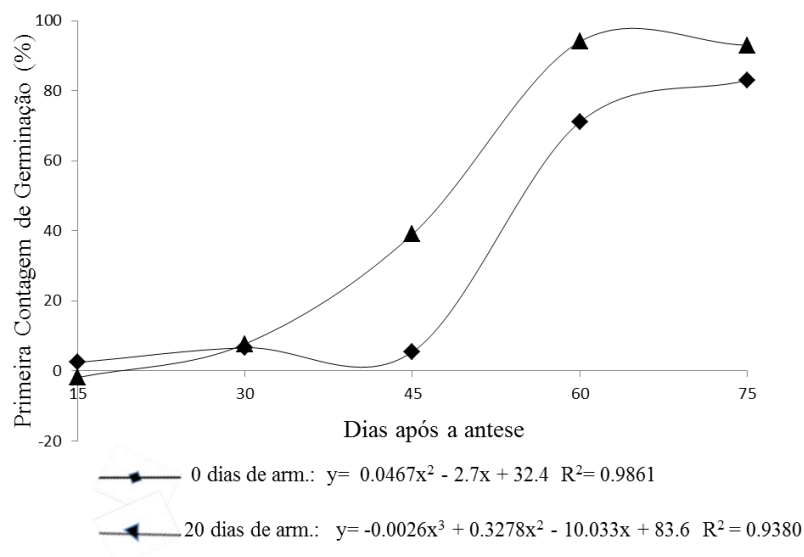


Figura 5. Primeira contagem de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Vale ressaltar que durante o processo de secagem das sementes podem ocorrer alterações na composição relativa de fosfolipídios de membrana (DUSSERT et al., 2006), na síntese de proteínas resistentes ao calor e na capacidade das sementes em prevenir, tolerar ou reparar danos causados por radicais livres. Nesse processo, as proteínas resistentes ao calor, como as proteínas LEA, possuem importante função de prevenir os danos causados pela secagem (FARIA et al., 2003; VIDIGAL et al., 2009a), acumulando-se em resposta ao ácido abscísico, nos últimos estádios de maturação das sementes.

A concentração de proteína solúvel total nas sementes foi crescente no decorrer do período de maturação, sendo observado que as sementes provenientes de frutos armazenados por 20 dias apresentaram concentração maior de proteínas até os 60 DAA, que estabilizou até os 75 DAA (Figura 6). Pode-se observar que o decréscimo no teor de água das sementes (Figura 7) acompanha o aumento dos teores das substâncias de reserva durante o desenvolvimento e isso, possivelmente, contribuiu para maior concentração das proteínas nas sementes de abóbora e, conseqüentemente, para a germinação (Figura 5). Ressalta-se, também, que a função principal das proteínas de reserva é o suprimento de aminoácidos para a formação de novas proteínas durante a germinação (PERNOLLET E MOSSÉ, 1983).

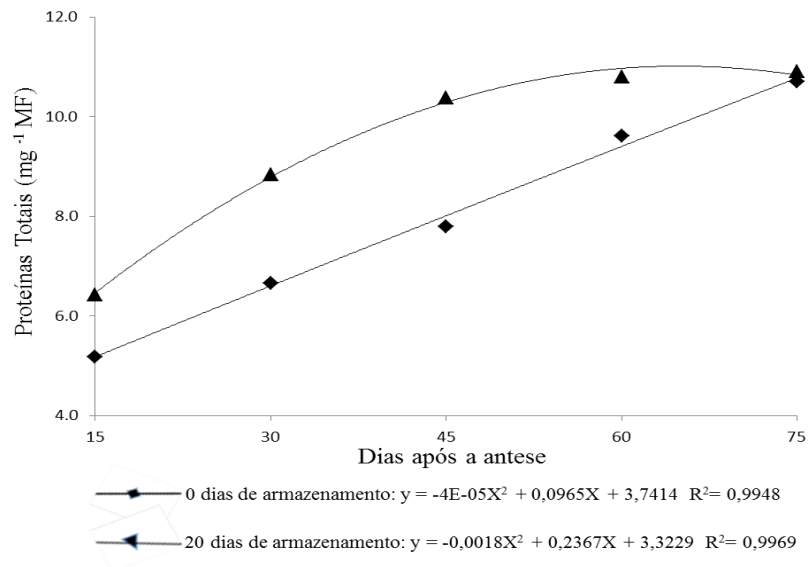


Figura 6 Concentração de proteína solúvel total em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

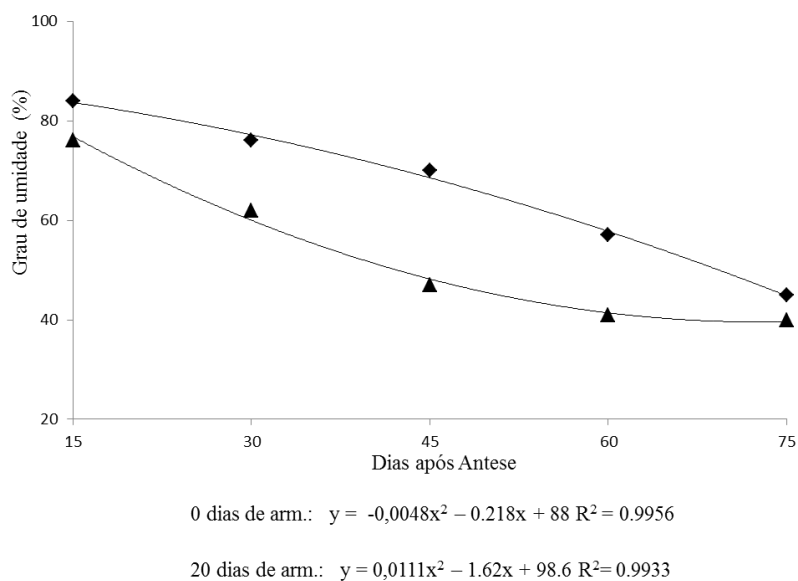


Figura 7. Grau de umidade das sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A enzima SOD é a primeira na barreira enzimática contra o estresse oxidativo, devido a sua atuação na dismutação do $O_2^{\bullet-}$, transformando-o em $H_2O_2 + O_2$ (BLOKHINA et al., 2003; GRATÃO et al., 2005; GILL e TUTEJA, 2010). É encontrada em diferentes compartimentos celulares, como nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no citossol e, possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002). Exerce um importante papel de proteção à célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos, sendo considerada essencial na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Na análise da sua atividade nas sementes de abóbora, observou-se decréscimo no decorrer dos estádios de maturação das sementes (Figura 8), sendo que, no geral, as sementes provenientes de frutos armazenados apresentaram menor atividade, comparativamente às sementes provenientes de frutos não armazenados.

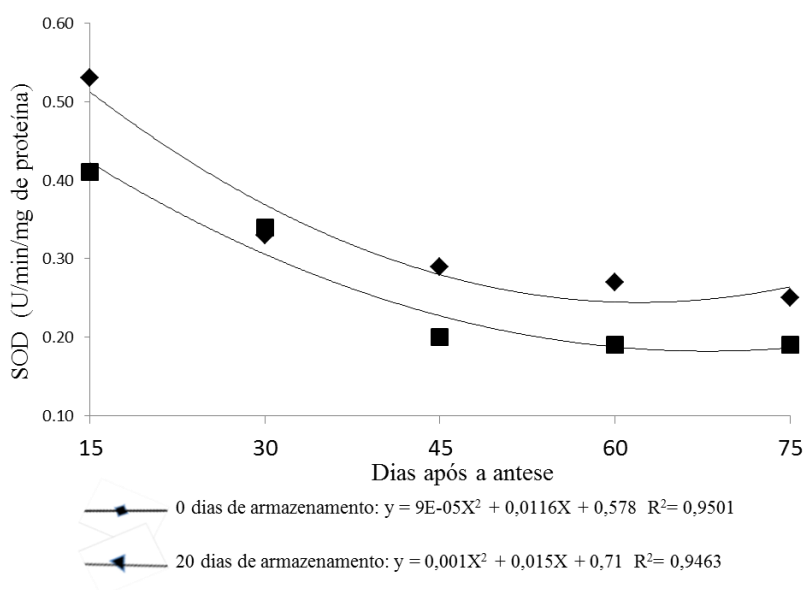


Figura 8. Concentração da proteína superóxido dismutase (SOD) em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Resultado semelhante foi observado em sementes de pepino por NAKADA et al. (2011), onde a concentração da SOD foi crescente somente até

os 40 DAA. Por outro lado, VIDIGAL et al. (2009b) trabalhando com sementes de pimenta, observaram aumento da atividade dessa enzima em sementes obtidas de frutos colhidos aos 50 DAA e armazenados por 6 dias. SILVA (2006), também observou que a atividade da SOD em sementes de soja foi intensa durante todos os estádios de maturação avaliados; neste caso, provavelmente, deve ter ocorrido a formação de radicais livres nas sementes imaturas durante a secagem, ativando a SOD como mecanismo de reparo celular, para promover a remoção de oxigênio molecular (O_2) nas sementes.

Os mecanismos de defesa são de extrema importância para a conservação da qualidade das sementes. Conhecidos como sistemas enzimáticos, estão envolvidos na resposta antioxidativa para neutralizar o oxigênio singlete e outros radicais livres que são formados sob condições de estresse (DUSSERT et al., 2006; CONTRERAS-PORCIA et al., 2010), como por exemplo, durante o processo de secagem.

A secagem das sementes provoca acúmulo de EROs e radicais livres nas células (NTULI et al., 2011), ocasionado pela ruptura dos plastídios e da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (FERREIRA e ABREU, 2007). A elevação da concentração desses radicais é potencialmente tóxica à integridade celular, sendo capaz de induzir à oxidação e despolimerização de ácidos nucleicos, a desnaturação de proteínas e a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática (KRANNER et al., 2010).

A alta concentração de H_2O_2 gerado pela atividade da SOD também é tóxica à célula, sendo de fácil permeabilidade pelas membranas (MELONI et al., 2003). O excesso de H_2O_2 nas células pode causar danos ao metabolismo celular, uma vez que este composto é capaz de oxidar os grupos $-SH$ de enzimas, inativando-as. E, nesse processo, as enzimas peroxidase (POX), catalase (CAT) e ascorbato da peroxidase (APX) são de extrema importância para a remoção do excesso de H_2O_2 (ARORA et al., 2002; GILL E TUTEJA, 2010), devido às suas diferenças na afinidade pelo H_2O_2 , com a APX na ordem de μM e a CAT e a POX, em mM. Dessa forma, enquanto a APX é responsável pela modulação refinada das EROs para a sinalização, a CAT é responsável pela remoção do excesso de EROs gerados durante condições de estresse. A APX, por sua vez, degrada o H_2O_2 , utilizando o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, o que gera

monodehidroascorbato que é regenerado novamente a ascorbato para que o sistema antioxidante se mantenha ativo (MITTLER, 2002).

Observou-se decréscimo na atividade da enzima CAT ao longo da maturação das sementes, sendo que, nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 15 DAA e armazenados por 20 dias, a concentração foi de 0,66 mg e já nas sementes oriundas de frutos colhidos com 75 DAA e armazenados por 20 dias, a concentração foi de 0,21 mg (Figura 9). Ressalta-se mais uma vez que as sementes provenientes de frutos que foram armazenados apresentaram menor atividade enzimática, demonstrando assim maior resistência à secagem. SILVA (2006), obteve o mesmo resultado ao estudar a atividade da catalase em sementes de soja em diferentes estádios de maturação. O autor observou redução decrescente da atividade devido à aquisição da tolerância à secagem, associada a maiores valores de germinação.

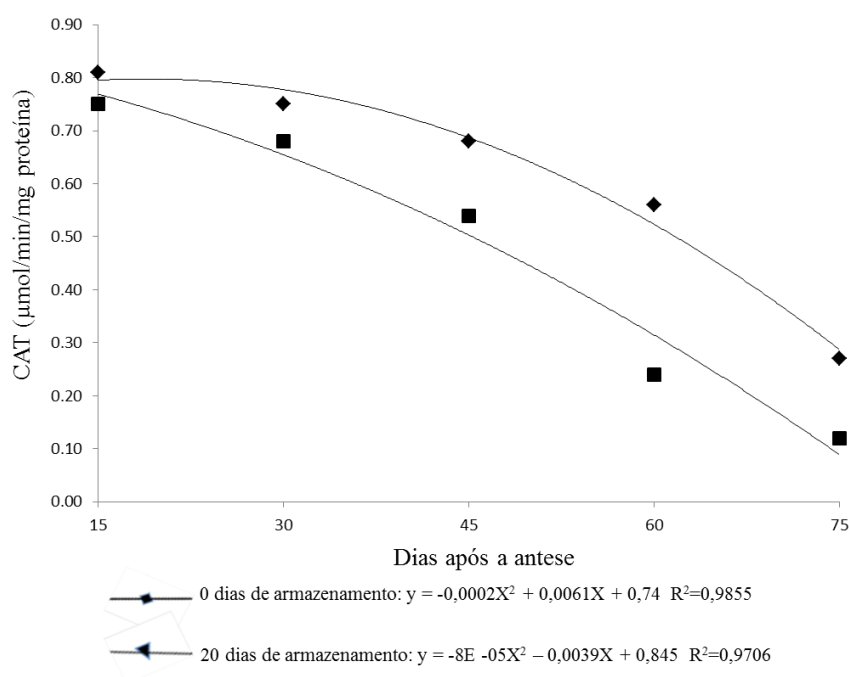


Figura 9. Concentração da proteína catalase (CAT) em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

O padrão da atividade da POX (Figura 10), após a secagem das sementes foi semelhante ao obtido para a CAT. Observou-se que a atividade desta enzima foi menor em sementes que estavam no início do seu processo de maturação, ou seja, a partir dos 45 DAA, sendo que as sementes provenientes de frutos armazenados apresentaram concentração inferior. A possível explicação para esse fato é que as sementes de frutos que passaram por um período de repouso apresentaram maior tempo para completarem sua maturação e as sementes maduras têm sua qualidade fisiológica preservada pelo fato de manterem-se em equilíbrio osmótico dentro do fruto (BARBEDO et al., 1994), apresentando maior viabilidade e vigor, confirmando desta maneira os resultados observados nos testes fisiológicos descritos no Capítulo I.

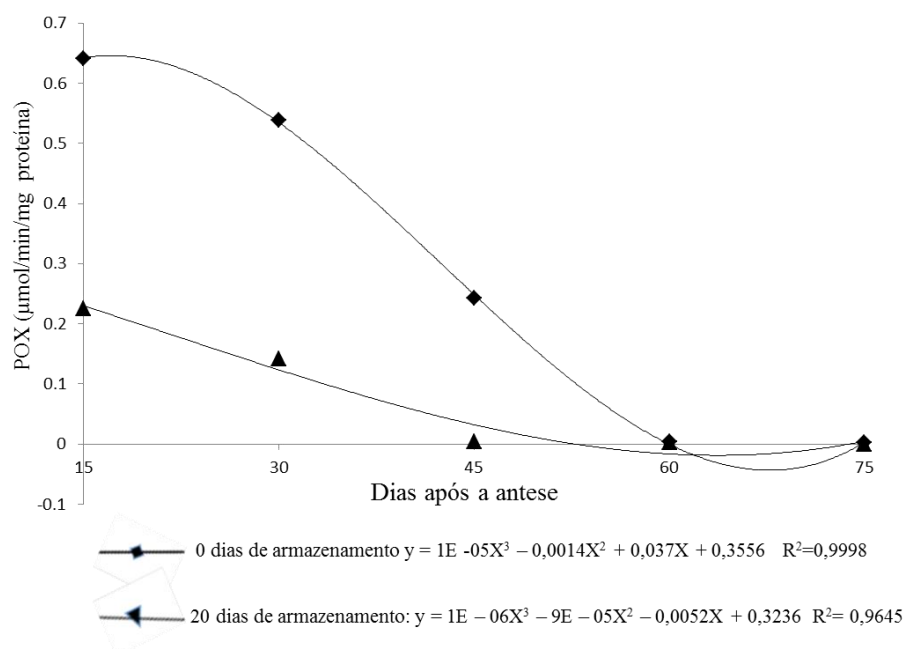


Figura 10. Concentração da proteína peroxidase (POX) em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A peroxidase encontra-se amplamente distribuída nos compartimentos celulares, sendo associada às paredes e membranas celulares, organelas, vacúolos e ao citosol (GILL e TUTEJA, 2010). Além de permitir distribuição mais ampla nas células do que a da CAT, a POX apresenta massa molecular de 35 kDa, permitindo maior mobilidade onde sua ação seja requerida

(SIEGEL, 1993). A POX desempenha importante papel no metabolismo das sementes, contribuindo para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda da qualidade (USHIMARU et al., 2001), principalmente, pelo fato de oxidar grande variedade de substâncias doadoras de hidrogênio como, por exemplo, os fenóis, os grupos com anéis aromáticos, diaminas, ácido ascórbico, aminoácidos, além de alguns íons inorgânicos por meio do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NKANG, 1996; HORVÁTH et al., 2002).

Por sua vez, a enzima ascobarto da peroxidase que se encontra principalmente no citosol (ARORA et al., 2002), podendo ser encontrada associada às mitocôndrias, peroxissomos e apoplastos (MITTLER, 2002), apresentou redução na sua atividade ao longo da maturação das sementes (Figura 11). Atividades mais intensas dessa enzima em fases precoces do processo de maturação das sementes são indicativo de que sua ação de defesa, para redução de superóxido, e consequente redução da formação de radicais livres, apresenta demanda maior nesses períodos, seja em função do processo de deterioração ou pela imaturidade das sementes.

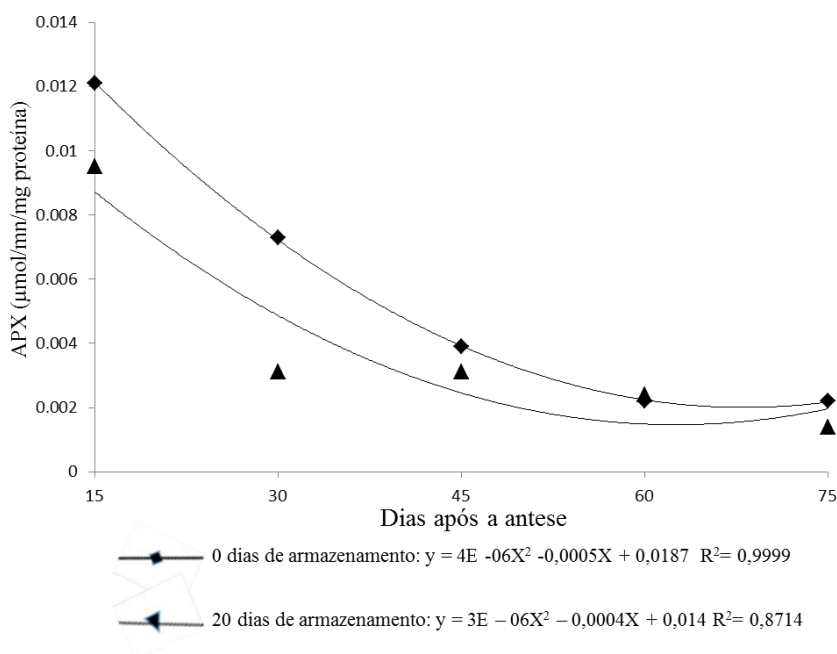


Figura 11. Concentração da proteína ascobarto da peroxidase (APX) em sementes de abóbora obtidas de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A APX possui maior afinidade pelo H_2O_2 (μM) em relação à CAT e à POX (mM) (MITTLER, 2002). No entanto, no presente trabalho, observou-se que a atividade da CAT foi mais atuante na remoção do H_2O_2 do metabolismo celular. Em geral, observou-se maior atividade das enzimas antioxidantes até o momento em que as proteínas LEA começassem a serem processadas pelas sementes, confirmando que, até os 30 DAA, as sementes encontram-se intolerantes à dessecação e, dessa forma, apresentam maior atividade das enzimas antioxidantes.

De maneira geral, as sementes provenientes de frutos colhidos até 30 DAA apresentaram elevada concentração de enzimas antioxidantes e baixa concentração de proteínas LEA. Isto demonstra que essas sementes encontravam-se imaturas e a secagem provocou danos em suas membranas celulares com aumento e acúmulo de EROs e, conseqüentemente, aumento da atividade das enzimas antioxidantes, levando as sementes a não resistirem aos danos oxidativos causados pela exposição à secagem. Esse comportamento pode explicar a menor germinação e vigor das sementes imaturas de abóbora.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C.; PETRES, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G .C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N; HEALTH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331-1341, 2002.

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, p.1227-1238, 2002.

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.14-18, 1994.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds:** physiology of development and germination. 2.ed, New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

CONTRERAS-PORCIA, L.; THOMAS, D.; FLORES, V.; CORREA, J. Á. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p.1815-1829, 2010.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLES, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DELL'AQUILA, A. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. **Seed Science Research**, v. 4, p.293-298, 1994.

DIONISIO-SESE, M.L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, v. 135, p.1-9, 1998

DUSSERT, S.; DAVEY, M.W.; LAFFARGUE, A.; DOULBEAU, S.; SWENNEN, R.; ETIENNE, H. Oxidative stress, phospholipids loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, v.127, p.192-204, 2006.

FARIA, M.A.V.F.; VON PINHO, R.G.; VON PINHO, E.V. de R.; GUIMARÃES, R.M. **Marcadores moleculares da qualidade fisiológica de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 51p.

FARIA, M.A.V.R., VON PINHO, R.G., VON PINHO, E.V.R., GUIMARÃES, R.M. AND FREITAS, F.E.O. Germinabilidade e tolerância à dessecação em sementes de milho colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, p. 276-289, 2004.

FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.M. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II. Lipids. **Crop Science**, v.30, p.179-182, 1990.

FERREIRA, I.C.F.R; ABREU, R.W.V. Stress oxidativo, antioxidante e fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 2, p. 32-39, 2007.

FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, A.P.O.; FIOREZA, N.G.; MYSKIN, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.F. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochemistry International**, v. 50, p.164-171, 2007.

GALAU. G.A.; BIJAISORADAT, N.; HUGHES, D.W. Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant (LEA) mRNAs and storage protein

mRNAs: coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. **Developmental Biology**, v. 123, p. 198-212, 1997.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p.309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEAD, P.J.; AZEVEDO, R.A.A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.53-64, 2005.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Ed). **Free radical in biology and medicine**. Clarendon, 1989. p.86-123.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HAN, B.; HUGHES, W.; GALAU, G.A.; BEWLEY, J.D.; KERMODE, A.R. Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. **Planta**, v. 201, p.27-35, 1997.

HONG-BO, S.; LIANG ZONG-SUO, L.; MING-ANA, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 45, p. 131-135, 2005.

HORVÁTH, E.; JANDA, T.; SZALAI, G.; PÁLDI, E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isoenzymes and a

possible role in the induction of chilling tolerance. **Plant Science**, v.163, p.1129-1135, 2002.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v.34, p.713-721, 1993.

KRANNER I.; MINIBAYEVA, F.V.; BECKETT, R,P. SEAL, C.E. What is stress? Concepts, definition and applications in seed science. **New Phytologist**, v.188, p.655-673, 2010.

MARTINS, L. L.; MOURATO, M. P. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: estresse oxidativo. **Revista Agros**, v 8, p.6, 2008.

MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental Experimental Botany**, v.49, p.69-76, 2003.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p.405-410, 2002.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v.27, p. 177-237, 1999.

MOLLER, I. M.; JÉNSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-81, 2007.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C.; GOMES, L.A.A.; VON PINHO, E.V.R.; Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 113-122, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NKANG, A. Effect of cyanide pretreatment on Peroxidase activity in germinating seeds of *Guilfoylia monostylis*. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.3-8, 1996.

NTULI T.M.; FINCG-SAVAGE, W.E.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Increased drying rate lowers the critical water content for survival in embryonic axes of English oak (*Quercus robur* L.) seeds. **Journal of Integrative Biology**, v. 53, p.270-280, 2011.

OLIVER M.J.; BEWLEY J.D. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, v.18, p.171-213, 1997.

ORT, D.R.; BAKER, N.R. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.193-198, 2002.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIN, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PERNOLLET, J.C.; MOSSÉ, J. Structure and location of legume and cereal seed proteins. In. DUSSANT, J.; MOSSÉ, J.; VAUGHAN, J. Seed proteins. London: Academic, 1983, p. 155-191.

SHAN, X. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71. 1990.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 303-312, 1993.

SILVA, P.A. **Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja**. 2006. 55f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SOFO, A., DICHIO, B., XILOYANNIS, C. E MASIA, A. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes, Functional. **Plant Biology**, v. 32, p. 45-53, 2005.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The glassy state and accelerated aging of soybeans. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 767-774, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Second Edition, p.751-753.1998.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.; PHILLIPS, A.D. Effects of field weathering on the viability and on vigor of soybean seed. **Agronomy Journal**, v.72, p.749-753, 1980.

USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; KATAYAMA, M.; TSUJI, H. Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. **Physiologia Plantarum**, v.112, p.39-46, 2001.

VANGRONSVELD; J. H. CLIJSTERS. Toxic effects of metals. In: Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity, Ed. M. E. Farago, **VCH Publishers**, p.150–177, 1994.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; VON PINHO, E.R.; DIAS, L.A.S. Sweet pepper seed quality and Lea-protein activity in relation to fruit and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, v.31, p.192-201, 2009a.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; VON PINHO, E.R.; DIAS, L.A.S. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta

(*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31,p.129-136, 2009b.

WASSMANN, R., N.X. HIEN, C.T. HOANH, T.P. TUONG. Sea Level Rise affecting Vietnamese Mekong Delta: Water Elevation in Flood Season and Implications for Rice Production. **Climatic Change**, v. 66, p.89-107, 2004.

Capítulo III

Estudo morfológico de sementes híbridas de abóbora em diferentes estádios de maturação através do uso de raios-X

¹Patrícia P. Silva; ¹Antonio C.S.A. Barros; ²Júlio Marcos-Filho; ³Warley M Nascimento. ¹Universidade Federal de pelotas – RS; ²USP/ESALQ - Depto. Produção Vegetal; ³Embrapa Hortaliças.

Resumo

A produção de sementes híbridas de abóbora com alta qualidade fisiológica é fundamental para colocar a produção nacional em condições de competitividade com as sementes importadas. Uma técnica que vem sendo utilizada recentemente para estudos relacionados à qualidade das sementes bem como para elucidação de vários aspectos do comportamento destas é a análise de imagens, incluindo as obtidas por meio dos raios-X. Esta técnica consiste em radiografar sementes com o objetivo de avaliar a morfologia interna e, assim, estabelecer relações com o desempenho das sementes. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar se a técnica de raios-X pode ser utilizada com sucesso na detecção de anormalidades e seus reflexos na qualidade fisiológica de sementes de abóbora, colhidas em diferentes estádios de maturação (aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese - DAA, com e sem armazenamento dos frutos por 20 dias). Foram utilizadas sementes híbridas de abóbora 'Jabras'. Em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo que quinze foram armazenados por vinte dias em caixas plásticas vazadas e o restante teve suas sementes extraídas imediatamente após a colheita. No teste de raios-X, as sementes foram submetidas a uma intensidade de 25kV por 40 segundos e em seguida, foi conduzido teste de germinação sob temperatura alternada de 20-30 °C. Após quatro dias, foi realizada a primeira contagem e, após oito dias, a última contagem, computando-se as porcentagens de plântulas normais, anormais e as sementes mortas. Posteriormente, compararam-se os resultados obtidos pelos dois testes avaliando-se as respectivas imagens da morfologia interna de cada semente, obtidas por meio do teste de raios-X. Foi constatado que a utilização da técnica de raios-x é

eficiente na detecção de sementes cheias, mal formadas e vazias de abóbora, e ainda, confirma os resultados obtidos nos testes fisiológicos, onde as sementes provenientes de frutos colhidos a partir dos 60 DAA e armazenados por 20 dias apresentaram qualidade superior.

Palavras Chaves: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, germinação, análise de imagens.

Abstract

Morphological study of squash hybrid seeds at different stages of maturation through the use of x-rays

The production of pumpkin hybrid seeds with high physiological quality is critical to placing domestic production in terms of competitiveness with the imported seeds. One technique that has been recently used to assess seed quality and to elucidate some aspects of seed physiology is the analysis of images, including those obtained by means of X-ray radiograph. The technique consists of to radiograph the seeds to study the internal morphology and thus to establish relations with the seed performance. So, the objective of this study was to examine if the X-rays may be used successfully in the detection of abnormalities and to correlate their effects on the physiological seed quality of pumpkin, harvested at different maturity stages (15, 30, 45, 60 and 75 days after anthesis (DAA) with and without fruit storage for 20 days). Jabras pumpkin hybrid seeds were used in this study. In every age, thirty fruits were harvested, and fifteen were stored for twenty days in plastic boxes and the other fifteen had their seeds extracted immediately after harvesting. In the X-ray test, seeds were radiographed using an intensity of 25 kV for 40 seconds and then was conducted germination under alternating temperature of 20-30 ° C. After four and eight days, it was performed the percentage of normal and abnormal seedlings and dead seeds. The results of both tests were evaluated comparing their images of the internal morphology of each seed, obtained by means of X-ray test. The use of x-rays is effective in detecting full, malformed and empty pumpkin seeds. This confirm the results obtained in the seed physiological tests, where the seeds from 60 DAA and stored for 20 days were superior.

Keywords: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, maturation, X rays, germination.

Introdução

As abóboras, do ponto de vista sócio econômico, são importantes por fazerem parte da alimentação básica das populações de várias regiões do Brasil, tendo alcançado, em 2008, o volume comercializado de 90.606 toneladas (TALAMINI e RAMOS, 2011). Apenas no segmento de abóbora japonesa (tipo tetsukabuto), no ano de 2010, o mercado de sementes foi de R\$ 10,5 milhões (ABCSEM, 2011). Grande parte dessas sementes é importada. Nesse aspecto, a solução para problemas relacionados à obtenção de sementes de elevada qualidade fisiológica é fundamental para colocar a produção nacional em condições de competitividade com as sementes importadas. As informações disponíveis sobre o assunto são escassas e inconclusivas em relação a alguns aspectos importantes, como a melhor época para a realização da colheita dos frutos, o período necessário para que as sementes atinjam a maturidade fisiológica e procedimentos adequados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes de abóbora.

Sabe-se que a partir da maturidade fisiológica, a deterioração é contínua e irreversível; assim, a determinação do ponto de maturidade fisiológica da semente assume grande importância na racionalização da colheita que objetive a produção de sementes de elevada qualidade fisiológica e, até certo ponto, qualidade sanitária, uma vez que, quanto maior o tempo decorrido entre o ponto de maturidade fisiológica e a colheita, mais sujeita está a semente às adversidades climáticas e ao ataque de insetos e microrganismos patogênicos.

O momento da maturidade fisiológica das sementes varia acentuadamente em função das condições ambientais predominantes, da espécie ou cultivar utilizados, podendo, em alguns casos, estar associado a modificações nas características morfológicas dos frutos e sementes, o que facilita a sua identificação no campo. Em outros casos, principalmente quando se trata de frutos carnosos, como é o caso da abóbora, o ponto de maturidade fisiológica das sementes pode ser influenciado por um período de repouso pós-

colheita dos frutos, antes da extração das sementes. Neste caso, há relatos de que sementes provenientes de frutos imaturos podem apresentar qualidade fisiológica comparável à das sementes extraídas de frutos maduros, desde que estes frutos imaturos sejam convenientemente armazenados por um determinado período antes da extração das sementes (PEDROSA et al., 1987; BARBEDO et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2000), respectivamente para abóbora, pepino e berinjela.

Assim, para uma análise mais conclusiva a respeito da qualidade fisiológica das sementes, há necessidade de se complementar os resultados fornecidos pelo teste de germinação com informações relativas à morfologia interna, ocorrência de danos e ainda verificações da evolução do desenvolvimento das sementes, avaliando-se o progresso da diferenciação dos tecidos embrionários e de suas relações com os tecidos de reserva (CRAVIOTTO et al., 2002); este exame pode ser realizado por meio da análise de raios-x.

A técnica de raios-X de em sementes foi iniciada na Suécia no ano de 1953, por SIMAK e GUSTAFSSON, com a espécie *Pinus sylvestris* L., tendo como princípio a exposição da semente a um feixe de radiação, na faixa espectral dos raios-X, proveniente de uma fonte emissora. Os raios, ao atravessarem a semente e atingirem o filme, permitem a formação de uma imagem, caracterizada por diferentes tonalidades de cinza. Durante a análise, ocorre a absorção de raios-X em diferentes quantidades pelos tecidos das sementes, em função de sua estrutura, composição e densidade, além do período de exposição à radiação (ISTA, 2004). Essa técnica é recomendada pela *International Seed Testing Association* (ISTA), que a considera um método rápido e não destrutivo, sendo recomendado com a finalidade básica de detectar sementes cheias, vazias, com danos mecânicos ou ataques de insetos.

Sua eficiência já foi comprovada em diversos trabalhos, sendo utilizada para identificação de sementes cheias, vazias, danificadas morfológicamente e na caracterização e detecção de danos internos em sementes (CICERO et al., 1998). A técnica também já se mostrou eficiente para avaliação de danos mecânicos em sementes de soja (FLOR et al., 2004), avaliação de fissuras em sementes de arroz (MENEZES et al., 2012) e injúrias mecânicas em sementes

de milho (GOMES JUNIOR e CICERO, 2012), entre outras aplicações. A técnica tem sido ainda utilizada para relacionar a morfologia interna da semente com a germinação ou a morfologia de plântulas, como, por exemplo, em sementes de tomate (VAN DER BURG et al., 1994) e pimentão (GAGLIARDI e MARCOS FILHO, 2011).

O teste de raios-X tem sido considerado eficiente na avaliação da qualidade fisiológica das sementes, pois é um método preciso. O teste não causa mutações nas sementes, devido à baixa dose de radiação absorvida durante o procedimento e, assim, não afeta a germinação. Dessa forma, as sementes submetidas à análise podem ser colocadas para geminar permitindo o estabelecimento de relações entre sua morfologia interna e a germinação. Além disso, as imagens obtidas podem ser catalogadas, arquivadas e utilizadas posteriormente para a definição de critérios de avaliação não subjetivos, padronizados e, conseqüentemente, mais precisos do que aqueles baseados apenas na visão humana (MENEZES et al., 2005; ISTA, 2004).

A situação atual sobre o uso potencial da análise de imagens em diversos segmentos da avaliação da qualidade de sementes ainda é muito restrita diante da ampla diversidade de espécies produzidas, sistemas de produção e de problemas que exigem procedimentos mais eficientes para sua solução. Assim, este trabalho teve como objetivo básico focalizar o tema análise de imagens de raios-x no estudo sobre morfologia interna e monitoramento da formação de sementes. Independentemente do fator de variação, a meta fundamental foi verificar até que ponto e em que situações essas técnicas de análise digitais processadas em computador viabilizam o estabelecimento de diagnósticos associados ao desempenho de amostras de sementes. Utilizaram-se para isso, como modelo, sementes de abóbora híbrida 'Jabras', provenientes de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, armazenados ou não,. As informações obtidas neste estudo poderão ser estendidas ou utilizadas para outras espécies de cucurbitáceas ou mesmo para outras olerícolas.

Material e Métodos

As sementes da abóbora híbrida 'Jabras', resultante do cruzamento entre *Cucurbita maxima* (linhagem feminina) e *Cucurbita moschata* (linhagem

masculina), foram produzidas em telados no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, no período de maio a outubro de 2012, através de polinização manual. As colheitas dos frutos foram realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA), sendo que, em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo quinze frutos armazenados por 20 dias em caixas plásticas, em local arejado, e quinze frutos, tiveram suas sementes extraídas imediatamente após a colheita. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente por 24 horas. Na etapa seguinte, as sementes foram transferidas para uma câmara com ventilação e temperatura a 32 °C, por 48 horas. As sementes secas foram então beneficiadas em soprador pneumático. O mesmo procedimento foi realizado com as sementes oriundas dos frutos armazenados. Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas à análise de raios-X no Laboratório de Análises de Imagens e no Laboratório de Análise de Sementes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, no período de janeiro a fevereiro/2013. O teste de germinação foi realizado no Laboratório de Sementes da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, em fevereiro de 2013. A metodologia utilizada em cada análise é descrita a seguir:

Determinação do grau de umidade: foi utilizado o método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), empregando-se aproximadamente 2g de sementes em cada recipiente, com duas repetições para cada tratamento. O teste foi realizado nas sementes após terem sido submetidas à secagem.

Utilização de raios-X para avaliação da morfologia interna das sementes
- o teste de raios-X foi realizado com cinco repetições de 20 sementes de cada tratamento. As sementes foram colocadas em alvéolos de uma placa de acrílico e numeradas de acordo com a posição ocupada nesta, de maneira que pudessem ser identificadas nas determinações posteriores. A placa de acrílico contendo as sementes foi colocada diretamente sobre um filme de raios-x (Kodak MIN-R EV 2000, tamanho 18x24cm). As imagens foram obtidas com intensidade de 25 kV e 40 segundos de exposição, utilizando-se o equipamento FAXITRON X-Ray, modelo MX-20 (Figura 1). A revelação foi efetuada em uma processadora Hope X-Ray, modelo 319 Micromax. As imagens dos filmes de

raios-x foram capturadas por um Scanner Umax, modelo Power Look 1100, para ampliação e visualização em computador.



Figura 1. Equipamento FAXITRON X-Ray, modelo MX-20, utilizado para realização da análise de raios-X.

Após a revelação das radiografias, as sementes foram classificadas de acordo com sua morfologia interna em: a) sementes cheias: aquelas com áreas vitais (tecidos essenciais) normalmente estruturadas; b) sementes mal formadas: sementes com áreas vitais mal estruturadas; c) sementes vazias.

Teste de germinação para avaliação de características e desempenho de sementes de abóbora: Foi realizado com as cinco repetições de 20 sementes de cada tratamento utilizadas no teste de raios-X, em rolo de papel de germinação, tipo “germitest”, umedecido com água destilada na proporção de 2,0 vezes a sua massa, em germinador com temperaturas alternadas de 20-30 °C. As avaliações foram realizadas aos quatro (primeira contagem de germinação) e aos oito dias, computando-se a percentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas. Comparou-se esse resultado com as respectivas imagens de raios-X.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, em arranjo bifatorial 5 x 2 (cinco épocas de colheita e dois períodos de armazenamento dos frutos). Os

dados foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação de médias efetuada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Após a análise de variância, foi realizada a análise de regressão pelo procedimento PROC REG do programa computacional SAS (SAS 9.1.3, 2000-2004).

Resultados e Discussão

As sementes apresentaram teor de água que variou de 6 a 9% (Figura 2). O teor de água das sementes é um fator de grande importância na utilização do estudo de raios-X, afetando a qualidade da imagem obtida, pois, quanto menor o teor de água das sementes, maior será sua densidade ótica, facilitando a diferenciação das estruturas internas por meio da radiografia (SIMAK, 1991).

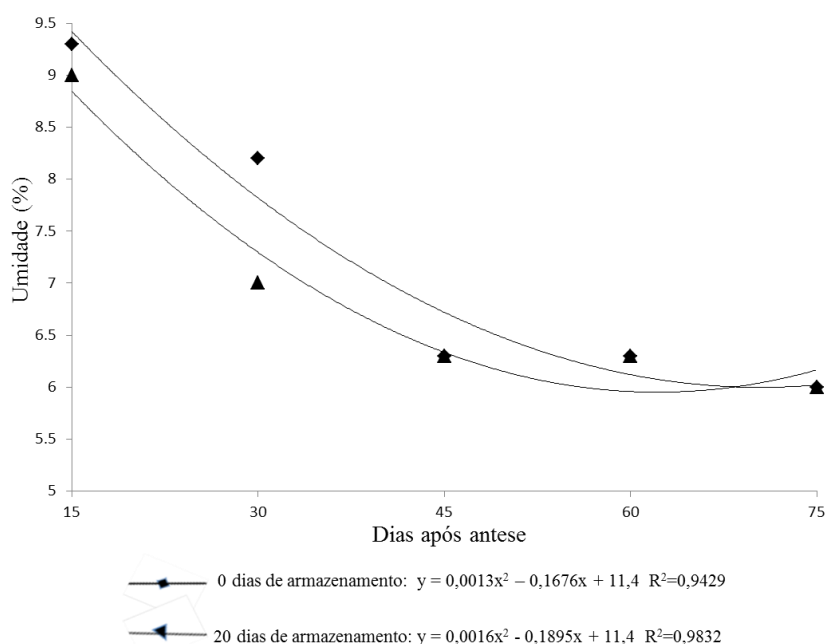


Figura 2. Grau de umidade água de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A regulação do aparelho de raios -X depende da espessura, densidade e composição da semente e do aparelho utilizado (ISTA, 2004; BINO et al., 1993). No presente trabalho, o período de exposição das sementes à radiação de 40 segundos e a intensidade de 25 kV possibilitaram uma visualização adequada das sementes de abóbora nas radiografias. Nestas condições, foi possível visualizar o desenvolvimento das estruturas internas das sementes. A tonalidade observada na análise de imagens radiográficas é definida em função do nível de absorção da radiação nas distintas regiões da semente, que é determinada pela espessura, densidade e composição dos tecidos (SIMAK, 1991; ISTA, 1993). Com isso, sementes que não possuem tecido embrionário, por não apresentarem resistência à passagem dos raios-X, fornecem imagens escuras.

Observou-se que somente as sementes provenientes de frutos colhidos aos 75 DAA e armazenados por 20 dias não apresentaram sementes vazias. Com relação às sementes classificadas como mal formadas, somente aquelas oriundas de frutos colhidos aos 30 DAA não apresentaram esse tipo de anormalidade, uma vez que todas essas sementes foram classificadas como vazias (Tabela 1). As sementes cheias foram observadas em vários tratamentos. Como esperado, quanto maior o tempo de maturação dos frutos, maior o número de sementes cheias.

Tabela 1. Número de sementes cheias (SC), mal formadas (SM) ou vazias (SV) de abóbora ‘Jabras’ provenientes de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Frutos (DAA)	Extração (dias após a colheita)	SC	SM	SV
15	0	0	0	100
15	20	0	49	51
30	0	0	56	44
30	20	5	80	15
45	0	12	85	3
45	20	64	36	0
60	0	68	32	0
60	20	79	18	3
75	0	76	23	1
75	20	84	16	0

A técnica de raios-X auxilia na avaliação da viabilidade das sementes (SWAMINATHAN e KAMRA, 1961; OLIVEIRA et al., 2003). Para se obter resultado confiável, é preciso estabelecer uma relação entre as estruturas internas das sementes, observadas na radiografia, com as respectivas plântulas ou sementes mortas. De modo geral, observou-se pelos testes de primeira contagem e germinação (Figuras 3 e 4), que os tratamentos com maior porcentagem de sementes cheias apresentaram melhor qualidade fisiológica em relação aos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram observados por CARVALHO et al. (2009), em sementes de abóbora, onde foi observado que os lotes com maior número de sementes cheias, apresentaram maior porcentagem de germinação; estes autores observaram ainda que as sementes danificadas fisicamente interferiram negativamente na germinação.

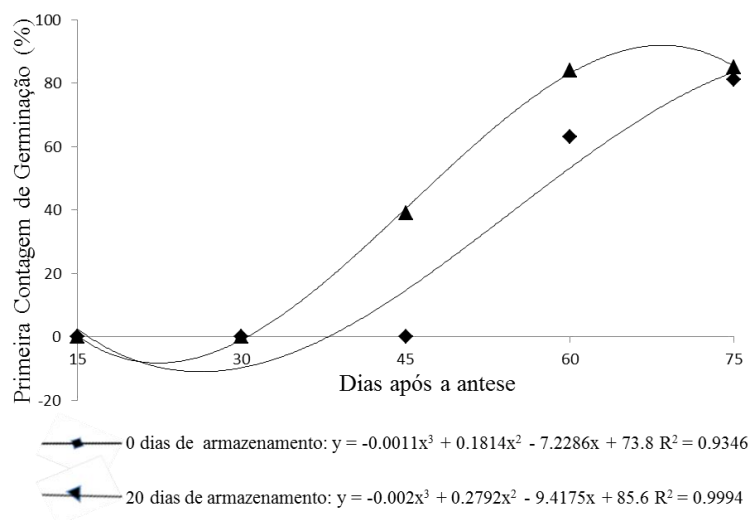


Figura 3. Primeira contagem de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a colheita (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

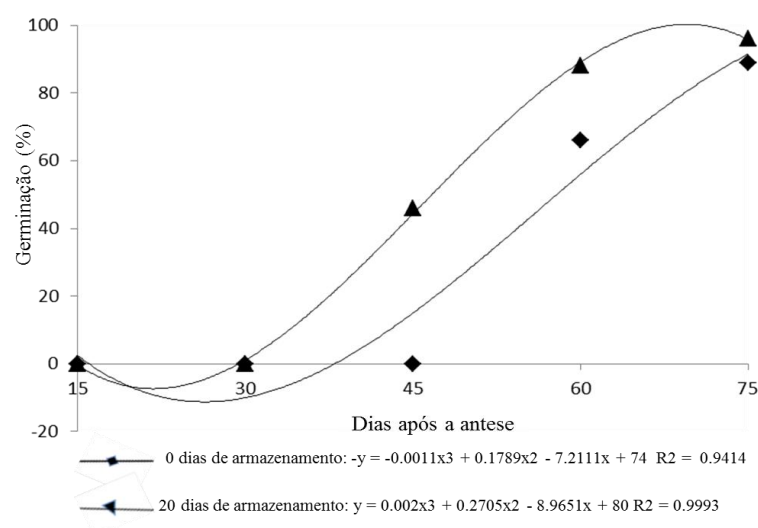


Figura 4. Germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a colheita (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Verificou-se, ainda, que os resultados obtidos no teste de germinação foram concordantes com a classificação de sementes no teste de raios-X, sendo constatada, no entanto, a presença de plântulas normais e anormais nas sementes classificadas como cheias (Figura 5). É importante destacar que no teste de raios-X é possível visualizar, detalhadamente, a morfologia interna da semente, ou seja, se a semente está bem formada ou se apresenta problemas, como injúrias mecânicas, danos causados por insetos, presença de tecidos em estado avançado de deterioração, entre outros; entretanto, algumas sementes bem formadas e aparentemente sem nenhum problema podem originar plântulas anormais ou sementes mortas, pois o teste de raios-X não possibilita a detecção de determinados problemas fisiológicos, como, por exemplo, fases intermediárias do processo de deterioração, que poderiam estar afetando o processo de germinação (BURG et al., 1994).

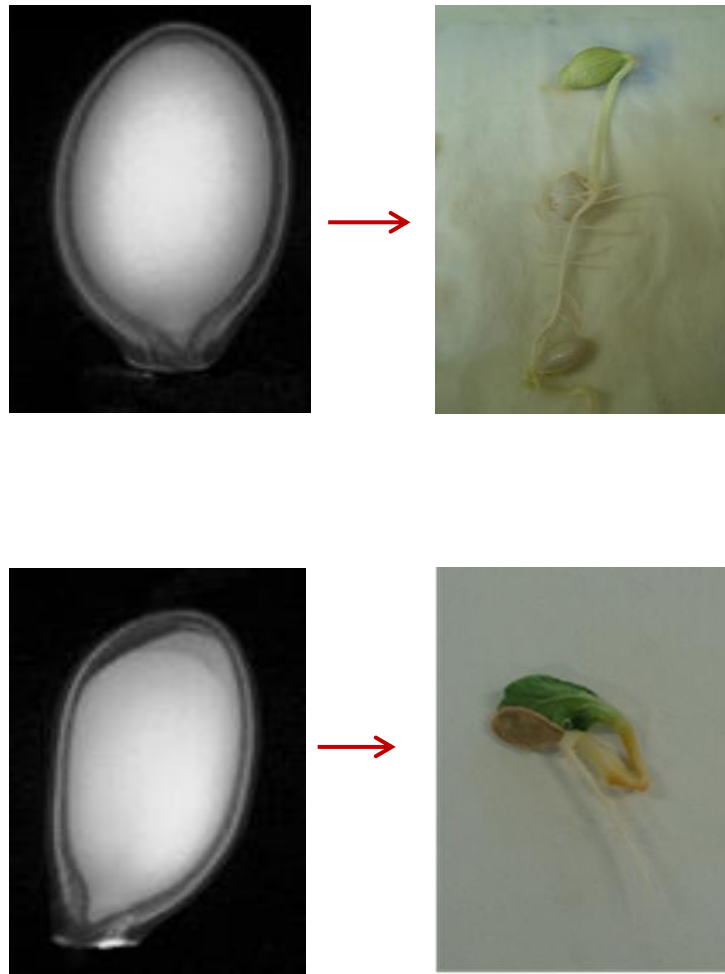


Figura 5. Sementes de abóbora classificadas como cheias pelo teste de raios-X resultando no desenvolvimento de plântulas normais (acima) e anormais (abaixo), no teste de germinação.

A maior parte das sementes classificadas como cheias pelo teste de raios-X originou plântulas normais no teste de germinação; a maioria daquelas classificadas como mal formadas apresentou plântulas anormais; por outro lado, 100% das sementes vazias não germinaram (Figura 6). Resultados semelhantes foram obtidos por PUPIM et al. (2008), em sementes de embaúba e por SILVA et al. (2014), em sementes de abóbora.



Figura 6. Sementes de abóbora classificadas com vazia (acima), mal formada (centro) e cheia (abaixo) pelo teste de raios-X, e suas respectivas plântulas ao final do teste de germinação, apresentando, respectivamente, semente não germinada, plântula anormal e plântula normal.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam as afirmações de que a morfologia interna das sementes pode ser um indicativo do seu potencial de viabilidade. A utilização da técnica de raios-X mostrou-se eficiente na determinação da morfologia interna das sementes de abóbora nas diferentes épocas avaliadas, mostrando que as sementes provenientes de frutos colhidos

a partir dos 60 DAA e armazenados por 20 dias apresentaram maior número de sementes cheias, indicando sua qualidade fisiológica superior em relação aos demais tratamentos e concordando com as avaliações fisiológicas e bioquímicas realizadas anteriormente nos capítulos I e II.

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS – ABCSEM. **Dados da Cadeia Produtiva de Hortaliças - Frente Parlamentar Hortifrutiflorgranjeiros** - 2011. Disponível em: <abcsem.com.br> . Acesso em: 10 mar. 2014.

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.118-124, 1994.

BINO R.J.; AARTASE J.W.; VAN DER BURG W.J. Non-destructive x-ray analysis of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, v. 3, p. 167-170, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BURG W.J.; ARTESE J.W.; ZWOL R.A.; JALINK H.; BINO R.J. Predicting tomato seedling morphology by x-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, p. 258-263, 1994.

CARVALHO, M.L.M.; SILVA, C.D.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.G.; CALDEIRA, C.M. Teste de raios-x na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 221-227, 2009.

CRAVIOTTO, R.M.; YOLDJIAN, A.M.; SALINA, A.R.; ARANGO, M.R.; MATURO, H. Description of pure seed fraction of oat through usual evaluations and radiographic images. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1183-1188, 2002.

CICERO, S.M.; HEIJDEN, G.W.A.M.; BURG, W.J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v.26, p. 603-612, 1998.

FLOR, E.P.O.; CICERO, S.M.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.68-76, 2004.

GAGLIARD, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola**, v.68, p. 411-416, 2011.

GOMES JUNIOR, F.G.; CICERO, S.M. X-Ray analysis to assess mechanical damage in sweet corn seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, p. 78 – 85, 2012.

ISTA- International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**, v.21, p.363, 1993. (Supplement).

ISTA- International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**, v. 27, p. 333, 2004. (Supplement).

MENEZES, N.L.; CICERO, S. M.; VILLELA, F. A. BORTOLOTTI, R. P. Using X-rays to evaluate fissures in rice seeds dried artificially. **Revista Brasileira de Sementes** , v. 34, p. 70-77, 2012.

MENEZES, N.L.; CÍCERO, S.M.; VILLELA, F.A. Identificação de fissuras em sementes de arroz após a secagem artificial, por meio de raios-x. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1194-1196, 2005.

NASCIMENTO, W.M.; LIMA, L.B.; ALVARES, M.C. Maturação de sementes híbridas de berinjela. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.1040-1041, 2000. (Suplemento).

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de raios-x na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, p. 116-120, 2003.

PEDROSA, J.F.; OLIVEIRA, G.M.; NETO, F.B.; MONTEIRO, M.R. Influência da idade e armazenamento do fruto na produção e qualidade de sementes de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*. **Horticultura Brasileira**, v.5, p.15-17, 1987.

PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CICERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p.28-32. 2008.

SILVA, P.P.; FREITAS, R.A.; CICERO, S.M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. M. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 148-152, 2014.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by x radiography. In: GORDON, A. G.; GOSLING, P.G.; WANG, B. **Tree and shrub seed handbook**. 1991. p-14-28. 1991.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, v.39, p.458-468, 1953.

SWAMINATHAN, M.S.; KAMRA, S.K. X-ray analysis of the anatomy and viability of seed of some economic plants. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, v. 4, p. 129-135, 1961.

TALAMINI, V.; RAMOS, S.R.R. **Agron Agronegócios online**. Disponível em: <agron.com.br/v/30135-a-escolha-da-semente-e-muito-importante/html>.

Acessado em fev., 2014.

VAN, D.E.R.; BURG, W.J.; AARTSE, J.W.; VAN ZWOL, R.A.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, p.258-263, 1994.

Capítulo IV

Avaliação do vigor de sementes híbridas de abóbora utilizando análise computadorizada de imagens

¹Patrícia P. Silva; ¹Antonio C.S.A. Barros; ²Júlio Marcos-Filho; ³Warley M. Nascimento. ¹Universidade Federal de Pelotas – RS; ²USP/ESALQ - Depto. Produção Vegetal; ³Embrapa Hortaliças.

Resumo

Durante a fase de maturação fisiológica, algumas sementes apresentam potencial para germinação, mas, na maioria das vezes, essa germinação resulta em plântulas anormais, ou menos vigorosas como aquelas que seriam obtidas de sementes colhidas no ponto de maturidade fisiológica. Os testes de vigor vêm se tornando ferramentas cada vez mais necessárias para a determinação do potencial fisiológico de um lote de sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de verificar a eficiência de um sistema computadorizado para análise de imagens de plântulas de abóbora para determinar o vigor durante diferentes estádios de maturação das sementes. Utilizou-se a cultivar híbrida de abóbora ‘Jabras’, decorrente do cruzamento entre *Cucurbita maxima* (linhagem feminina) e *Cucurbita moschata* (linhagem masculina). Foram utilizadas sementes obtidas de frutos com diferentes estádios de maturação (frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAA, e armazenados ou não por 20 dias. As sementes foram submetidas aos testes: *Seed Vigor Imaging System* – SVIS[®] para avaliação do vigor, germinação, primeira contagem de germinação, massa de 1000 sementes e envelhecimento acelerado com uso de solução saturada de NaCl. O sistema de análise computadorizada de imagens de plântulas forneceu dados referentes ao índice de vigor, à uniformidade de desenvolvimento e ao crescimento das plântulas, aos três dias após a instalação do teste de germinação. O resultado obtido pela análise computadorizada SVIS[®] foi semelhante ao resultado dos outros testes de vigor utilizados no estudo, detectando diferenças significativas entre os índices de vigor, comprimento, crescimento e uniformidade de plântulas, provenientes de sementes obtidas de frutos colhidos a partir de 45 DAA e armazenados por 20 dias. Esse resultado demonstra que o sistema de análise

computadorizada de imagens pode ser uma alternativa viável para a obtenção de informações consistentes sobre o potencial fisiológico de sementes de abóbora.

Palavras-chave: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, análise de plântulas, potencial fisiológico.

Abstract

Vigor of pumpkin seeds using computerized image analysis

During physiological maturity, some seeds show germination potential, but most often, this germination results in abnormal or less vigorous seedlings as those obtained from seeds harvested at physiological maturity point. The vigor tests are important tools to determine the physiological potential of a seed lot. The objective of this study was to determine the effectiveness of a computerized system for image analysis of pumpkin seeds to determine the seed vigor during different stages of seed maturation. Jabras squash hybrid seeds, resulting from a cross between *Cucurbita maxima* (female parent) and *Cucurbita moschata* (male parent) were used in this study. Seeds with different maturity stages (from fruits harvested at 15, 30, 45, 60 and 75 DAA, with and without storage for 20 days) were used. Seeds were subjected to the following tests: Seed Vigor Imaging System - SVIS ® for evaluation of seed vigor, germination, first count, weight of 1000 seeds and accelerated aging in saturated NaCl solution. The system of computerized seed image analysis supplied data to the index of vigor, uniformity of development and growth of seedlings, three days after the installation of the germination test. The result obtained by computer analysis SVIS ® was similar to the result of the other vigor tests used in this study by detecting significant differences between the indices of vigor, length, growth and uniformity of seedlings from seeds obtained from fruits harvested from 45 DAA and stored for 20 days. This result demonstrates that the system of computerized images analysis may be a viable alternative to obtain consistent information on the physiological potential of pumpkin seeds.

Keywords: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, seedling analysis, physiological potential.

Introdução

O potencial fisiológico de um lote de sementes é geralmente avaliado pelo teste de germinação, realizado sob condições controladas e favoráveis para a espécie considerada (LIMA e MARCOS-FILHO, 2009). Apenas essa informação pode ser insuficiente, pois à medida que as condições ambientais se desviam das mais adequadas para o estabelecimento das plântulas ou para a conservação das sementes, a emergência de plântulas é inferior à germinação, determinada em condições favoráveis em laboratório (MARCOS-FILHO, 1999a).

Durante o processo de maturação fisiológica, sementes ainda não maduras podem germinar, contudo, geralmente não resultam em plântulas vigorosas, como as que seriam obtidas de sementes colhidas no ponto de maturidade fisiológica (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Assim, os testes de vigor vêm se tornando ferramentas cada vez mais necessárias para a determinação do potencial fisiológico de sementes, constituindo parâmetros fundamentais na composição de programas de controle de qualidade (MARCOS-FILHO, 1999b).

A avaliação do vigor, apesar de fundamental importância para determinação do potencial fisiológico de um lote de sementes, necessita avançar, principalmente em termos de padronização e no desenvolvimento de testes capazes de fornecer resultados com mais rapidez e precisão, sendo este fator de fundamental importância para a evolução da indústria brasileira de sementes. A padronização é importante, pois à medida que as técnicas de manejo cultural tornam-se mais sofisticadas, aumenta a necessidade do uso de sementes de alta qualidade (McDONALD, 1998). Para algumas culturas, como as olerícolas, poucos são os testes de vigor padronizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Dentre os testes utilizados para a avaliação do vigor de sementes de cucurbitáceas, pode-se citar o envelhecimento acelerado com o emprego de solução saturada de NaCl (BHERING et al., 2000; ABDO et al., 2005) e o teste

de frio (CASAROLI et al., 2006a,b). O teste de envelhecimento acelerado é um dos mais indicados para ser utilizado em programas de controle de qualidade de sementes (MARCOS-FILHO et al., 2000), sendo capaz de separar lotes de sementes da mesma espécie de acordo com o potencial das sementes quanto à formação de plântulas normais em condições adversas. O teste de envelhecimento acelerado foi desenvolvido por DELOUCHE (1965), avaliando o comportamento de lotes de sementes de trevo e festuca submetidos à temperatura e umidade relativamente elevadas, tentando estimar o potencial relativo de armazenamento das sementes. No Brasil, o primeiro autor a publicar trabalho utilizando o teste de envelhecimento acelerado foi Toledo, no ano de 1966, estudando o vigor de sementes de algodão. Posteriormente, surgiram os primeiros estudos mais aprofundados e específicos sobre o teste, realizados por WETZEL (1972), CALDO (1973) e KRZYZANOWSKI (1974).

O teste de envelhecimento acelerado baseia-se no aumento do nível de deterioração das sementes expostas a condições de temperatura e umidade relativa elevadas por períodos relativamente curtos, sendo, em seguida, colocadas para germinar (MARCOS-FILHO, 1999b). Lotes de sementes com alto vigor devem manter sua viabilidade quando submetidos a tais condições, enquanto que os lotes de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida (AOSA, 2002).

Para as sementes de hortaliças, o teste de envelhecimento acelerado pode apresentar certas limitações, como a desuniformidade de absorção de água entre as amostras, resultando em uma deterioração diferenciada, comprometendo assim os resultados. Visando minimizar esse problema, JIANHUA e McDONALD (1997), propuseram a substituição de água por soluções saturadas de sais. Com esse procedimento, há redução da umidade relativa do ambiente, retardando, assim, a absorção de água pelas sementes e o desenvolvimento de microrganismos nas sementes.

Apesar de ser recomendado para avaliar o vigor das sementes, o teste de envelhecimento acelerado não gera informações completas sobre a longevidade e vigor, mas apenas uma relativa distinção entre os lotes, permitindo melhor previsão a respeito do armazenamento e comercialização das sementes.

Neste sentido, os testes de vigor são muito úteis para o controle interno da qualidade das sementes, completando as informações fornecidas pelo teste de germinação, disponibilizando parâmetros mais sensíveis para seleção dos melhores lotes de sementes (MARCOS-FILHO, 1999b; DIAS, 2001). Diante dessa situação, uma alternativa foi proposta por SAKO et al., (2001), empregando a análise computadorizada de imagens de plântulas (*Seed Vigor Imaging System – SVIS[®]*) de alface, levando em consideração a intensidade, velocidade e uniformidade de desenvolvimento das plântulas. A técnica se baseia na captação de imagens digitais de plântulas, de três a quatro dias de idade, através de um escâner. Após a captura dessas imagens, as mesmas são processadas em um computador, o qual gera valores referentes ao índice de vigor (valores de 0 a 1000, diretamente proporcionais ao vigor), uniformidade de desenvolvimento (também de 0 a 1000) e comprimento de plântulas.

O procedimento para avaliação do vigor de sementes por meio do SVIS[®] é bem simples e o resultado é obtido entre dois a três minutos (GOMES JUNIOR, 2009). O sistema também elimina o erro humano aumentando, assim, a confiabilidade dos dados para posterior comparação, além de ser um procedimento de baixo custo (MARCOS-FILHO, 2005). Existem estudos recomendando sua realização para avaliação do vigor de sementes de cucurbitáceas (MARCOS-FILHO et al., 2006)

Desta forma, objetivou-se, com este trabalho, estudar o uso do 'software' para análise computadorizada de imagem de plântulas – SVIS[®] para avaliação do potencial fisiológico de sementes híbridas de abóbora durante diferentes estádios de maturação, comparando os resultados com as informações fornecidas pelo testes de envelhecimento acelerado com uso de solução saturada de NaCl.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens, do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, e no Laboratório de Sementes da Embrapa Hortaliças, Brasília – DF, no período de janeiro a

fevereiro de 2013. Utilizaram-se sementes da abóbora híbrida 'Jabras', que foram produzidas em telados no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF, no período de maio a outubro de 2012, através de polinização manual. As colheitas dos frutos foram realizadas aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA), sendo que, em cada época, foram colhidos trinta frutos, sendo quinze armazenados por vinte dias em caixas plásticas. Os frutos restantes tiveram suas sementes extraídas imediatamente após a colheita. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, as sementes foram transferidas para uma câmara com ventilação a temperatura de 32 °C, por 48 horas. As sementes secas foram então beneficiadas em soprador pneumático. O mesmo procedimento foi realizado com as sementes oriundas dos frutos armazenados. Após esses procedimentos, as sementes foram submetidas aos seguintes análises:

Análise computadorizada de imagens de plântulas: para obtenção das plântulas para análise de imagens, foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes cada para cada tratamento. As sementes foram colocadas para germinar em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a duas vezes a massa do papel seco, em germinador, a 25 °C. Após três dias, as plântulas foram transferidas do rolo de papel toalha para uma folha de cartolina preta, com 30 cm x 22 cm (correspondente à área útil atingida pelo escâner). Esta foi colocada na área externa do escâner HP Scanjet 2410, montado de maneira invertida no interior de uma caixa de alumínio, com 60 cm x 50 cm x 12 cm, e operado pelo software Photosmart, com resolução de 100 dpi (Figura 1). As imagens “escaneadas” foram analisadas pelo programa *Seed Vigor Imaging System -SVIS®*, instalado em computador Pentium IV, com CPU de 2,0 GHz, 768 MB RAM e HD de 40 GB, operado pelo sistema Windows XP Profissional. Após a análise e avaliação de cada plântula, o programa gerou valores numéricos referentes ao índice de vigor (valores de 0 a 1000, diretamente proporcionais ao vigor), uniformidade de desenvolvimento (também de 0 a 1000), comprimento de plântulas (cm) e crescimento.



Figura 1. Plântulas de abóbora posicionadas em escâner HP Scanjet 2004, montado de maneira invertida no interior de uma caixa de alumínio com 6 cm x 50 cm x 12 cm, e operado pelo software Photosmart, com resolução de 100 dpi.

Teste de germinação: conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, em rolo de papel de germinação, tipo “germitest”, umedecido com água destilada, na proporção de 2,0 vezes a massa do papel seco, em germinador com temperatura alternada de 20 °C (16h, escuro) e 30 °C (8h, luz). Foram realizadas contagens aos oito dias após a instalação do teste e as avaliações efetuadas conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes, sendo os resultados expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Primeira contagem de germinação: realizada conjuntamente com o teste de germinação, contabilizando-se o número de plântulas normais presentes no quarto dia após o início do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Envelhecimento acelerado: duzentas e cinquenta sementes de cada tratamento foram uniformemente distribuídas sobre uma tela de alumínio, fixada em caixas plásticas tipo “gerbox” (11 cm x 11 cm x 3,5 cm), contendo, no fundo, 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g de NaCl / 100 ml de água). As caixas contendo as sementes foram fechadas e mantidas a 41 °C, por 72 horas, em câmara de envelhecimento. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme metodologia descrita

anteriormente (BRASIL, 2009). A avaliação da protrusão da raiz primária foi realizada aos quatro dias após a instalação do teste.

Massa de 1000 sementes: oito subamostras de 100 sementes secas de cada tratamento foram pesadas, sendo a média dos resultados expressos em gramas (g) (BRASIL, 2009).

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, e analisado em um arranjo bifatorial 5 x 2 (cinco épocas de colheita e dois períodos de armazenamento dos frutos). Os dados em porcentagem foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação de médias efetuada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Após a análise de variância, foi realizada a análise de regressão pelo procedimento PROC REG do programa computacional SAS (SAS 9.1.3, 2000-2004), para os resultados dos testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado e massa de 1000 sementes.

Resultado e Discussão

A análise dos dados obtidos com as sementes dos dez tratamentos revelou diferenças significativas de potencial fisiológico entre elas. Esse resultado indica que os testes conduzidos foram sensíveis na detecção das diferenças entre o desempenho fisiológico das sementes nos diferentes estádios de maturação.

Em relação à germinação, foram obtidas diferenças significativas entre as épocas de colheita. A germinação foi crescente nas sementes obtidas de frutos colhidos a partir de 45 DAA e armazenados por 20 dias, observando-se certa estabilidade entre 60 e 75 DAA, sendo esse período considerado como uma possível indicação da maturidade fisiológica das sementes, que atingiram a máxima germinação (97%) aos 75 DAA, após 20 dias de armazenamento dos frutos (Figura 2). Em estudo com sementes de abobrinha, o teste de germinação detectou diferentes níveis de potencial fisiológico entre lotes (BARROS et al., 2002; CARDOSO, 2003). Entretanto, o teste não garantiu uma maior emergência de plântulas dos lotes com maior porcentagem de germinação (BHERING et al., 2000).

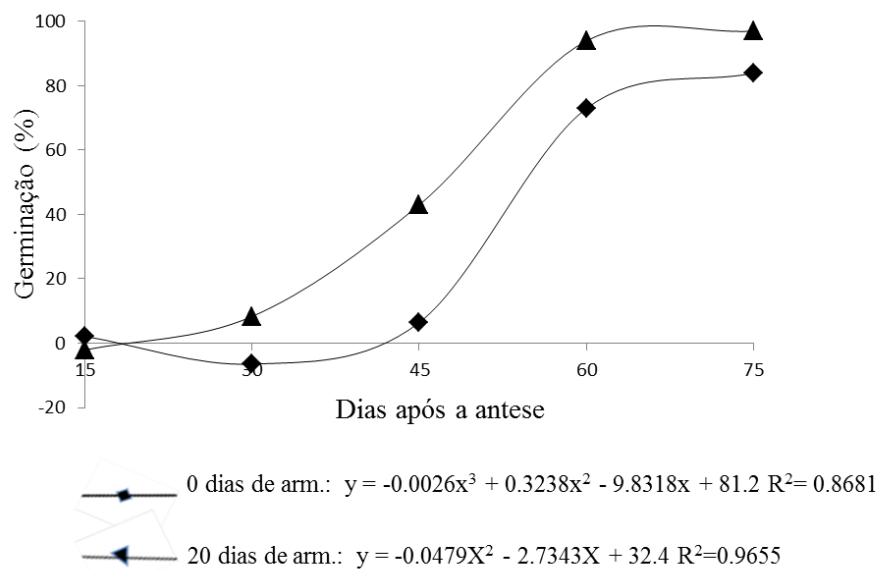


Figura 2. Média da germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A primeira contagem de germinação aumentou com a idade dos frutos e com o armazenamento dos mesmos (Figura 3), indicando que o vigor das sementes é diretamente proporcional à idade dos frutos. Através deste, observou-se maior vigor das sementes provenientes de frutos colhidos aos 60 DAA e armazenados por 20 dias, estabilizando-se a partir daí. Esse teste é utilizado rotineiramente para obter informações complementares sobre o vigor de lotes de sementes (BHERING et al., 2000). Segundo NAKAGAWA (1999), ele pode avaliar indiretamente a velocidade de germinação, expressando melhor as diferenças de velocidade de germinação entre lotes do que os índices de velocidade de germinação (IVG). A primeira contagem vem sendo utilizada para obtenção de informações sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes de pepino (BHERING et al., 2000) e alface (FRANZIN et al., 2004).

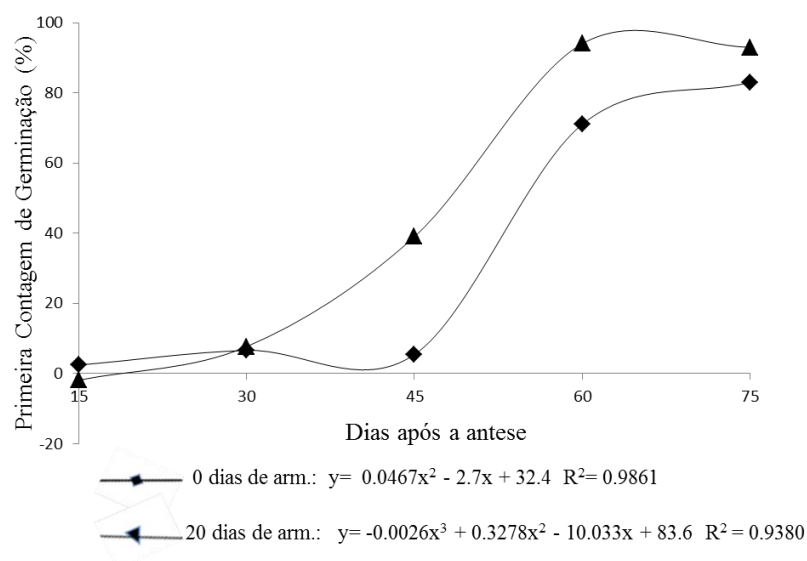


Figura 3. Primeira contagem de germinação de sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

A porcentagem de plântulas normais após o teste de envelhecimento acelerado apresentou aumento nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 45 DAA e armazenados por 20 dias (Figura 4). No teste de envelhecimento acelerado, as sementes de baixa qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, apresentando queda acentuada de sua viabilidade (BAALBAKI et al., 2009). Esse fato foi observado nas sementes provenientes de frutos colhidos aos 15 e 30 DAA com e sem armazenamento, bem como dos frutos colhidos aos 45 DAA e não submetidos ao armazenamento. A eficiência dos testes de envelhecimento acelerado tem sido documentada na literatura por vários autores, dentre os quais MARCOS-FILHO et al. (2000). O uso do teste de envelhecimento acelerado com emprego de soluções saturadas de sais apresenta ainda a vantagem de manter os valores de umidade relativa do ar em níveis inferiores, impedito o crescimento de microrganismos, minimizando os efeitos de patógenos sobre os resultados do teste (JIANHUA e McDONALD, 1996).

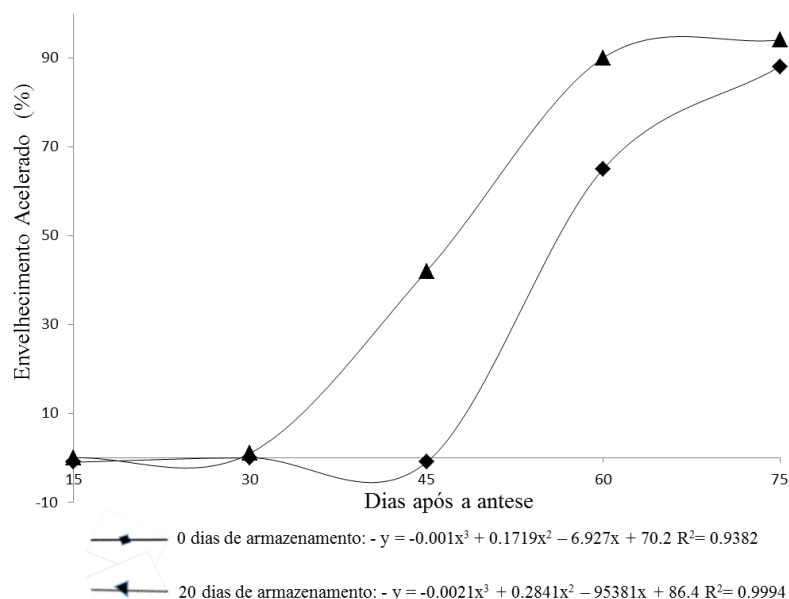


Figura 4. Envelhecimento acelerado com emprego de solução salina saturada em sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Na análise da massa de 1000 sementes também foi observado aumento gradativo, sendo que as sementes provenientes de frutos colhidos aos 75 DAA e armazenados por 20 dias apresentaram maior valor, consequentemente, essas sementes poderiam apresentar alto vigor (Figura 5). Na literatura, encontram-se alguns exemplos do efeito positivo da massa de sementes de abóbora no vigor das sementes. Quantificar a massa de 1000 sementes de uma amostra é um dado importante, pois obtém-se informações sobre a qualidade, ou seja, o estado de maturidade e sanidade, proporcionando, também, estimativa do tamanho das sementes (BRASIL, 2009). Diversos autores têm verificado correlação positiva entre a massa das sementes e o vigor, como GIANLUPPI (1988), em azevém (*Lolium multiflorum* Lam).

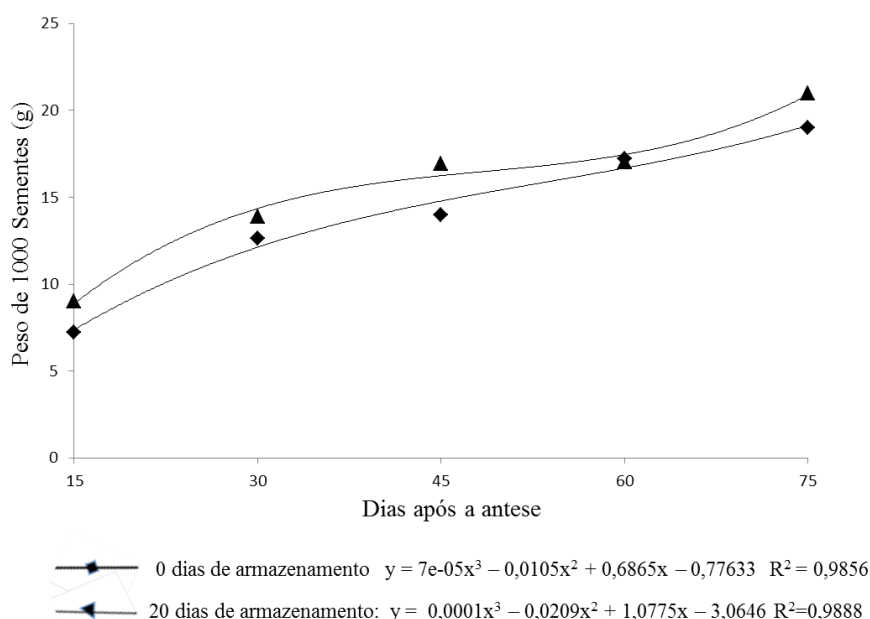


Figura 5. Média da massa de 1000 sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos com o SVIS[®], em que foram detectadas diferenças significativas entre os índices de vigor, comprimento, crescimento e uniformidade de plântulas nas sementes obtidas de frutos colhidos a partir dos 45 DAA e armazenados por 20 dias (Tabela 1). A aplicação dos testes de vigor para determinar a qualidade fisiológica durante a maturação das sementes é uma prática que permite estimar e comparar as diferentes fases de desenvolvimento das sementes oferecendo dados adicionais importantes em fases iniciais de programas de melhoramento ou conservação genética.

Tabela 1. Análise dos índices de vigor, uniformidade e comprimento de plântulas, determinados pelo SVIS®, em sementes híbridas de abóbora, provenientes de frutos colhidos aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a antese (DAA) e armazenados por 0 e 20 dias.

Tratamento	Crescimento	Uniformidade	Vigor	Comprimento de plântula
15 DAA	0d	0d	0d	0d
15 DAA + 20				
ARM	0d	0d	0d	0d
30 DAA	0d	0d	0d	0d
30 DAA + 20				
ARM	0.4d	102c	3.1d	0.08d
45 DAA	0d	0d	0d	0d
45 DAA + 20				
ARM	700bc	876a	753bc	4.4bc
60 DAA	645c	789ab	688c	4.0c
60 DAA + 20				
ARM	823b	855a	832b	5.2b
75 DAA	1000a	834a	949a	6.8a
75 DAA + 20				
ARM	826b	884a	844b	5.0b
CV	12.25	14.03	12.09	11.12

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na comparação entre os resultados obtidos pela análise de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado e massa de 1000 sementes, os valores médios obtidos confirmam com os valores obtidos pelo SVIS®. Dessa forma, a utilização do SVIS® mostrou-se consistente, já que o teste de envelhecimento acelerado com uso de soluções salinas saturadas é considerado eficiente para determinação do vigor em sementes de abóbora (BHERING et al., 2000; ABDO et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, a determinação do vigor de sementes por meio do SVIS® é bem mais simples e rápida. O tempo

necessário para gerar um índice de vigor a partir de imagens de plântulas com três dias de idade é menor que o requerido para executar o teste de envelhecimento acelerado (HOFFMASTER et al., 2005), por exemplo. Os resultados para uma amostra de 50 sementes podem ser obtidos em dois a três minutos, segundo GOMES JUNIOR et al. (2009), além do aumento da confiabilidade nos resultados, devido à eliminação do erro humano.

Os resultados obtidos nesse estudo proporcionaram informações importantes a respeito da determinação do potencial fisiológico de sementes de abóbora. As análises automatizadas realizadas pelo SVIS[®] permitiram identificar diferenças de qualidade fisiológica entre as sementes obtidas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, de maneira comparável aos resultados obtidos por outros testes recomendados para avaliação do vigor de sementes de cucurbitáceas.

Referências Bibliográficas

ABDO, M.T.V.N.; PIMENTA, R.S.; PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D. Testes de vigor para avaliação de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, p.195-198, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing, 2002. 93p.

BAALBAKI, R. BAALBAKI, R.Z.; ELIAS, S.; MARCOS FILHO, J.; McDONALD, M.B. **Seed vigor testing handbook**. Ithaca, New York: Association of Official Seed Analysts, 2009. 346p.

BARROS, D.I.; DIAS, D.C.F.S.; BHERING, M.C.; DIAS, L.A.S.; PUIATTI, M. Avaliação do vigor de sementes de abobrinha (*Cucurbita pepo*) pelo teste de tetrazólio. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p.1-5, 2002. (Suplemento 2. 1 CD-ROM).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; GOMES, J.M.; BARROS, D.I. Métodos para avaliação do vigor de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.171-175, 2000.

CALDO, A.O. **Efeito do envelhecimento controlado sobre a qualidade fisiológica de sementes de três variedades de soja**. 1973. 37 f. (Dissertação de Graduação) - Universidade Estadual paulista – Campus Jaboticabal, Jaboticabal, 1973.

CARDOSO, A. I. I. Produção e qualidade de sementes de abobrinha ‘Piramoita’ em resposta a quantidade de pólen. **Bragantia**, v. 62, p. 47-52, 2003.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000, 588p.

CASAROLI, D. GARCIA, D. C.; MENEZES, N. L.; MUNIZ, M. F. B.; BAHRY, C. A. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de abóbora. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 13, n. 2, p. 97-107, 2006a.

CASAROLI, D.; GARCIA, D. C.; MEDEIROS, N. L.; MUNIZ, M. F. B.; BAHRY, C. A. Teste de frio sem solo em sementes de abóbora. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1923-1926, 2006b.

DELOUCHE, J. C. An accelerated aging technique for predicting relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. **Agronomy ABSTRACTS**, 1965, p.40, 1965.

DIAS, D.C.F.S.; Maturação fisiológica de sementes: o processo. **Seed News**, v.5, n.6, p.22-24, 2001.

FRANZIN, S. M.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D.C.; WRASSE, C. F. Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 63-69, 2004.

GIANLUPPI, V. **Influência do peso de 1000 sementes na qualidade fisiológica de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.)**. 1988. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1988.

GOMES JUNIOR, F.G.; MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M.; McDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. **Seed Technology**, v.31, n.1, p.95-100, 2009.

HOFFMASTER, AL.; XU, L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A.; EVANS, A.F. The Ohio State University seed vigor imaging system (SVIS) for soybean and corn seedlings. *Seed Science and Technology*, v.27, p.7-24, 2005.

JIANHUA, Z.; MCDONALD, M.B. The salt accelerated test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v.25, p.123-131, 1996.

KRZYZANOWSKI, F.C.A. **Técnica de envelhecimento precoce na avaliação do vigor de sementes de feijoeiro**. 1974. 104 f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 1974.

LIMA L.B.; MARCOS-FILHO J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e relação com desempenho das plantas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p.27-37. 2009.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARCOS-FILHO, J. Conceitos e testes de vigor para sementes de soja. In: Congresso Brasileiro de Soja, 1. Anais Londrina, 1999a, p.220-226,

MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C. VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de Sementes**: conceitos e testes. Londrina, Abrates, 1999b. P, 1.1-1.21.

MARCOS-FILHO, J.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Tamanho da semente e teste de envelhecimento acelerado para soja. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 473-482, 2000.

MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M.A.; MCDONALD, M.B.; EVANS, A.F.; RASSBAUGH, E.M. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, v.34, p.485-497, 2006.

MCDONALD, M.B. Improving our understanding of vegetable and flower seed quality. **Seed Technology**, v.20, p.121-124, 1998.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina, Abrates, 1999. p. 1-20.

SAKO, Y.; MCDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 625-636, 2001.

WETZEL, C. T. **Contribuição ao estudo da aplicação do teste de envelhecimento visando a avaliação do vigor em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), de trigo (*Triticum aestivum* L) e de soja (MERRIL, G.M.L.).** 1972. 116 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

Conclusão final

Os ensaios realizados no presente estudo demonstram certa estabilidade nas sementes oriundas de frutos colhidos entre 60 e 75 DAA, sendo esse período considerado como uma possível indicação da maturidade fisiológica das sementes de abóbora 'Jabras', que atingiram a máxima germinação (97%) aos 75 DAA, após 20 dias de armazenamento dos frutos.

Durante essa fase de colheita e com o armazenamento dos frutos as sementes apresentaram uma alta germinação, além de baixa concentração de enzimas antioxidantes e alta concentração de proteínas LEA, demonstrando que essas sementes se encontravam em uma fase de maturação fisiológica ideal, devido ao fato da secagem não ter provocado danos em suas membranas celulares.

A utilização da técnica de raios-X mostrou que essas sementes apresentaram um maior número de sementes cheias, dessa forma, sua qualidade fisiológica foi superior aos outros tratamentos, concordando com as outras avaliações realizadas. E por sua vez, o vigor dessas sementes, obtido pela análise automatizada - SVIS[®] mostrou que as sementes se encontravam com alto vigor.